



**UNIVERSIDAD JUÁREZ AUTÓNOMA
DE TABASCO.**



*División Académica de Ciencias
Básicas*

**Bioensayo de los extractos de
Laguncularia racemosa, mediante la
evaluación de la toxicidad sobre *Galba
cubensis*.**

TESIS

Para la obtención del título de

**Maestro en Ciencias con Orientación en
Química Orgánica**

Presenta

L.Q. Erika Madeleyne Ramos Rivera

Directores de Tesis:

DR. LUIS FERNANDO ROA DE LA FUENTE (DACB)

DR. LUIS JOSE RANGEL RUIZ (DACBiol)

Cunduacán, Tabasco.

Mayo de 2015



UNIVERSIDAD JUÁREZ
AUTÓNOMA DE TABASCO

"ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE"

DIVISIÓN ACADÉMICA DE CIENCIAS BÁSICAS

Dirección



7 de mayo de 2015

Lic. en Química Erika Madeleyne Ramos Rivera
Pasante del Maestría en Ciencias
Con orientación en: Química Orgánica
P r e s e n t e.

Por medio del presente y de la manera más cordial, me dirijo a Usted para hacer de su conocimiento que proceda a la impresión del trabajo titulado **"Bioensayo de los extractos de *Laguncularia racemosa* mediante la evaluación de la toxicidad sobre *Galba cubensis*"** en virtud de que reúne los requisitos para el EXAMEN PROFESIONAL para obtener el grado de Maestro en Ciencias con orientación en: Química Orgánica.

Sin otro particular, reciba un cordial saludo.

Atentamente,

Dr. Gerardo Delgadillo Piñón
Director

DIVISIÓN ACADÉMICA DE
CIENCIAS BÁSICAS

DIRECCIÓN.

C.c.p.- Archivo
Dr'GDP/Dr'GBG/emt

Miembro CUMEX desde 2009
Consorcio de
Universidades
Mexicanas
UNA ALIANZA DE CALIDAD POR LA EDUCACIÓN SUPERIOR

Km. 1, Carretera Cunduacán-Jalpa de Méndez, A.P. 24, C.P. 86690, Cunduacán, Tabasco
Tel/Fax (914)3360928, (993)3581500 Ext. 6702

CARTA DE AUTORIZACIÓN

Quien suscribe, autoriza mediante el presente escrito a la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco para que utilice tanto física como digitalmente la tesis de grado denominada: "Bioensayo de los extractos de *Laguncularia racemosa* mediante la evaluación de la toxicidad sobre *Galba cubensis*", de la cual soy titular de los derechos de autor.

La finalidad del uso por parte de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco de la tesis antes mencionada, será única y exclusivamente para difusión, educación y sin fines de lucro; autorización que se hace de manera enunciativa mas no limitativa para subirla a la Red Abierta de Bibliotecas Digitales (RABID) y a cualquier otra red académica con las que la universidad tenga relación institucional.

Por lo antes manifestado, libero a la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco de cualquier reclamación legal que pudiera ejercer respecto al uso y manipulación de la tesis mencionada y para los fines estipulados en este documento.

Se firma la presente autorización en el municipio de Cunduacán Tabasco a los 8 días del mes de mayo del año 2015.

Autorizó



L.Q. Erika Madeleyne Ramos Rivera

El presente trabajo se desarrolló en el laboratorio de Química orgánica de la División Académica de Ciencias Básicas y en el laboratorio de Malacología de la División Académica de Ciencias Biológicas, ambas de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco bajo la dirección del Dr. Luis Fernando Roa de la Fuente y el Dr. Luis José Rangel Ruiz.

La realización de esta investigación se llevó a cabo con el apoyo económico recibido de asignación de beca de CONACYT con número de registro 488010 en el periodo de febrero de 2013 a julio de 2014.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

No es verdad que las personas paran de perseguir sueños porque se hacen viejos, se hacen viejos porque paran de perseguir sus sueños

Gabriel García Márquez

DEDICATORIA

A Dios

Por concederme la vida acompañada de felicidad y la oportunidad de cumplir este sueño.

A mi esposo

Carlos M. Hernández

Por el amor que me has demostrado al creer en mí e impulsarme a cumplir mis metas, ayudándome en todo momento incondicionalmente, este pequeño logro es también tuyo.

A mis hijos

Erik y Carlos

Quienes han sido el motor que me impulsa a ser mejor cada día y sin los cuales mi vida no tendría sentido. Los amo.

A mis padres

Martha E. Rivera y Vidal Ramos

Que con su amor y enseñanza han sembrado las virtudes que se necesitan para vivir con anhelo y felicidad. Gracias por su apoyo en cada etapa de mi vida.

A mis hermanos

Javier, Vidal y Miguel

Con quienes paso buenos momentos cuando estamos juntos. Gracias por estar ahí siempre con una sonrisa.

A mi suegra

Sra. Carmita Colorado

Por el tiempo, amor y paciencia dedicado a mis hijos en los inicios de mi proyecto. Gracias!

AGRADECIMIENTOS

A todas las personas e instituciones que hicieron posible la culminación de esta tesis.

A mis directores de tesis, el Dr. Luis Fernando Roa de la Fuente y al Dr. Luis José Rangel Ruiz por su valiosa dirección y apoyo en el desarrollo de este proyecto.

Al M.C. Juan Armando Arévalo de la Cruz, por el tiempo y orientación brindado en el laboratorio de malacología.

Al Dr. Gamaliel Blé González por el apoyo otorgado a todos los estudiantes de posgrado siempre con la mejor disposición.

A los miembros del comité revisor por sus comentarios y sugerencias que me permitieron afinar este trabajo.

Dra. Maricela de Jesús Alor Chávez

Dra. Nancy Romero Ceronio

Dr. Carlos Ernesto Lobato García

M.C. Abraham Gómez Rivera

A mis amigas de la maestría Wendy, Erika, Toñy y Vero por el apoyo brindado a lo largo del posgrado.

A los profesores y todo el personal del posgrado en Ciencias de la División Académica de Ciencias básicas de la UJAT.

ÍNDICE GENERAL

	Página
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	3
2. ANTECEDENTES	5
2.1 Productos naturales	5
2.1.1 Metabolismo secundario	6
2.1.2 Clasificación de los metabolitos secundarios	6
2.1.3 Biosíntesis	7
2.1.4 Alcaloides	8
2.1.5 Quinonas	9
2.1.6 Esteroides	10
2.1.7 Saponinas	11
2.1.8 Flavonoides	12
2.1.9 Taninos	13
2.1.9.1 Taninos hidrolizables	14
2.1.9.2 Taninos condensados o catéquicos	14
2.1.9.3 Biosíntesis de taninos	15
2.2 Malacología	16
2.2.1 La fasciolosis hepática	16
2.2.2 Hospedero intermediario	17
2.2.3 Ciclo biológico de Fasciola	18
2.3 Laguncularia racemosa	19
2.3.1 Información taxonómica	20
2.3.2 Distribución mundial	20
2.3.3 Distribución en México	20
2.4 Análisis PROBIT	21
2.5 Toxicidad de las plantas medicinales	21
2.5.1 Dosis tóxica	21
2.5.2 Dosis letal	22
2.5.3 Dosis letal 50	22
2.5.4 Dosis letal 90	22
2.5.6 Tiempo letal 50	22
2.5.7 Tiempo letal 90	22
3. JUSTIFICACIÓN	23
4. OBJETIVOS	25
4.1 Objetivo general	25
4.1.1 Objetivos particulares	25
5. METODOLOGÍA	26
5.1 Análisis fisicoquímicos	27
5.1.1 Humedad	27
5.1.2 Cenizas	27
5.1.3 Fibra cruda	28
5.1.4 pH	28
5.1.5 Salinidad	29

	Página
5.1.6 Obtención de los extractos hexánico, clorofórmico y metanólico	29
5.2 Análisis cualitativo de metabolitos secundarios	30
5.2.1 Identificación de alcaloides	30
5.2.2 Reconocimiento de flavonoides	30
5.2.3 Reconocimiento de saponinas	31
5.2.4 Quinonas	31
5.2.5 Taninos	31
5.2.6 Terpenos (triterpenoides) y/o esteroides	31
5.3 Cuantificación de los metabolitos predominantes	32
5.3.1 Cuantificación de saponinas	32
5.3.2 Cuantificación de taninos	33
5.3.3 Cuantificación de esteroides	34
5.3.4 Cuantificación de flavonoides	34
5.4 Metodología biológica	36
5.4.1 Colecta de la especie <i>Galba cubensis</i>	36
5.4.2 Preparación de terrarios	36
5.4.3 Determinación de grupos de estudio	36
5.4.4 Preparación de soluciones	36
5.4.5 Aplicación de los extractos	37
6. RESULTADOS Y DISCUSIONES	38
6.1 Análisis fisicoquímicos	37
6.2 Análisis cualitativo de metabolitos secundarios	40
6.3 Análisis cuantitativo de metabolitos predominantes	42
6.3.1 Cuantificación de esteroides	42
6.3.2 Cuantificación de saponinas	44
6.3.3 Cuantificación de flavonoides	46
6.3.4 Cuantificación de taninos	47
6.4 Pruebas biológicas	49
6.4.1 Preparación de las soluciones	48
6.4.2 Preservación y cuidado de los especímenes	48
6.4.3 Pruebas de toxicidad con el extracto metanólico	51
6.4.4 Determinación de la DL ₅₀	52
6.4.5 Determinación de la DL ₉₀	52
7. CONCLUSIONES	57
8. BIBLIOGRAFÍA	58

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Metabolitos secundarios y algunas de sus aplicaciones	6
Tabla 2. Análisis fisicoquímico realizado en hojas de <i>Laguncularia racemosa</i>	38
Tabla 3. Peso en gramos de los extractos obtenidos	39
Tabla 4. Identificación de metabolitos secundarios	40
Tabla 5. Valores leídos en la determinación de esteroides	42
Tabla 6. Cuantificación de esteroides	44
Tabla 7. Resultados de saponinas encontradas en el extracto metanólico	45
Tabla 8. Cuantificación de saponinas por índice de espuma	45
Tabla 9. Valores de las absorbancias detectadas en la determinación de flavonoides	46
Tabla 10. Cuantificación de flavonoides	46
Tabla 11. Valores promedio detectados en los estándares de ácido tánico	47
Tabla 12. Cuantificación de taninos	48
Tabla 13. pH y salinidad del extracto metanólico	52
Tabla 14. Mortandad acumulada de <i>G. cubensis</i> con el extracto metanólico a diferentes concentraciones	55
Tabla 15. Mortandad acumulada (%) de <i>G. cubensis</i> a diferentes tiempos	55

ÍNDICE DE GRÁFICAS

	Página
Gráfica 1. Determinación de esteroides	43
Gráfica 2. Determinación de taninos	48
Gráfica 3. DL, DL ₅₀ y DL ₉₀	54

ÍNDICE DE ESQUEMAS

	Página
Esquema 1. Vías de formación de los metabolitos secundarios	8
Esquema 2. Biosíntesis general de taninos	15
Esquema 3. Metodología	26

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Ejemplos de alcaloides	9
Figura 2. Clasificación de quinonas según su estructura	10
Figura 3. Núcleo ciclopentanoperhidrofenantreno	10
Figura 4. Ejemplo de saponina	11
Figura 5. Estructura básica del esqueleto flavonólico	12
Figura 6. Estructura del ácido gálico	13
Figura 7. Fasciola adulta	16
Figura 8. <i>Galba cubensis</i>	17
Figura 9. Ciclo biológico de Fasciola hepatica	18
Figura 10. <i>L. racemosa</i>	20
Figura 11. Metabolitos identificados en <i>L. racemosa</i>	40
Figura 12. Esteroides presentes	43
Figura 13. Saponinas identificadas	44
Figura 14. Taninos hidrolizables identificados	47
Figura 15. Acondicionamiento de terrarios	49
Figura 16. Monitoreo de la especie	51
Figura 17. <i>G. cubensis</i> antes y después de la aplicación del extracto metanólico	52

ABREVIATURAS

ml	Mililitros
mm	Milímetros
g/L	Gramos por litro
h	Horas
m	Metros
L	Litros
mg/ml	Miligramos por mililitros
UV	Ultravioleta
DL	Dosis letal
DL ₅₀	Dosis letal 50
DL ₉₀	Dosis letal 90
EM	Extracto metanólico
ppm	Partes por millón
CLAR	Cromatografía líquida de alta resolución
°C	Grados Celsius
s	Segundos
mM	Milimoles
nm	Nanómetros
pH	Potencial de Hidrogeno
<i>G. cubensis</i>	Galba cubensis
<i>F. hepatica</i>	Fasciola hepatica
<i>L. racemosa</i>	Laguncularia racemosa
<i>R. mangle</i>	Rhizophora mangle
FEUM	Farmacopea herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos
A	Absorbancias



RESUMEN

La extracción de metabolitos secundarios constituyentes de las plantas es esencial para realizar análisis fitoquímicos e identificar y cuantificar principios biológicamente activos. En este trabajo se realizaron tres extractos con diferentes disolventes de hojas de *Laguncularia racemosa*, para su posterior evaluación tóxica sobre la especie *Galba cubensis*, un caracol vector en la infección de *Fasciola hepatica* del ganado bovino en el Estado de Tabasco. Se desarrolló también un estudio fitoquímico a cada extracto con la finalidad de identificar y cuantificar los metabolitos secundarios presentes en mayor concentración. Los disolventes utilizados fueron: hexano, cloroformo y metanol. Los ensayos se realizaron por triplicado y las determinaciones cualitativas y cuantitativas de los distintos metabolitos se realizaron utilizando estándares analíticos propuestos por la Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos y ligeras modificaciones en la metodología. Se probaron diferentes concentraciones (1g/L, 2.5 g/L, 5 g/L, 10 g/L y 20 g/L) del extracto metanólico, de las que se aplicaron 3 ml de cada una a la especie *G. cubensis*, contenida en terrarios en el laboratorio, obteniéndose con ello muy buenos resultados en las primeras dos horas para las concentraciones más altas, el tiempo total de monitoreo fue de 24 h, mientras que el de observación fue de 96 h.





ABSTRACT

The extraction of constituents secondary metabolites of plants is essential for phytochemical analysis and identify and quantify biologically active substances. In this paper three extracts with different solvents of leaves of *Laguncularia racemosa* for further evaluation toxic species *Galba cubensis* a vector snail infection of *Fasciola hepatica* in cattle were performed in the State Tabasco. A phytochemical study each extract also developed in order to identify and quantify the secondary metabolites present in higher concentration. The solvents used were: hexane, chloroform and methanol. Assays were performed in triplicate and the qualitative and quantitative determinations of various metabolites were performed using analytical standards proposed by the Herbal Pharmacopoeia of the United States of Mexico and slight changes in methodology. Different concentrations (1 g / L, 2.5 g / L, 5 g / L, 10 g / L and 20 g / L) of methanol extract, of which 3 ml each were applied to the species *G. cubensis* were tested, contained in the laboratory terraria, thereby obtaining good results in the first two hours for the highest concentrations, monitoring the total time was 24 h, while the observation time was 96 h.



Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN



1. INTRODUCCIÓN

En las dos últimas décadas se ha producido un renovado interés en el campo de los productos naturales. Ahora somos conscientes de la diversidad de estructuras químicas que proporciona la naturaleza, lo que ha estimulado la búsqueda de nuevos compuestos bioactivos. Dichos compuestos constituyen herramientas útiles en el campo de la bioquímica y biología molecular para explorar con detalle la función celular. Con el desarrollo de la ecología química ha quedado patente el papel que desempeñan los productos naturales en las complejas relaciones de los organismos en un determinado ecosistema.¹

La fasciolosis es una zoonosis parasitaria causada por el tremátodo hermafrodita *fasciola hepatica*; afecta principalmente al ganado ovino, bovino, caprino, porcino, equino, otros animales herbívoros y accidentalmente al hombre.² La infección masiva del ganado, suele causarles la muerte; además se han registrado pérdidas económicas cuantiosas por el decomiso de los hígados parasitados y la baja en la producción de carne y leche.³ Normalmente, se utilizan los molusquicidas tradicionales (metaldehídos, carbamatos, sulfatos de hierro), tienen como objetivo matar caracoles y babosas, pero ignoran y dejan intactos los huevos que estos animales depositan en el suelo, por lo que nunca se controlará la plaga de una forma efectiva, ya que cada huevo depositado en el suelo originará un caracol. Además el ganadero aplica estos molusquicidas cuando observa el daño en el ganado, no establece medidas preventivas, y todo esto es debido a la ignorancia sobre la biología de la plaga.⁴ Además, el uso constante de éstos productos son perjudiciales a flora y fauna de los alrededores donde se aplican.

Una alternativa ecológica es el uso de extractos de plantas endémicas, con el objeto de tener un fácil acceso a ellas en cualquier época del año y usando sólo las partes aéreas que son fácilmente regeneradas por el árbol.

Muchas plantas pertenecientes a diversas familias han sido objeto de estudios con el fin de determinar su potencial uso como molusquicidas, para ello, sus especies han sido seleccionadas tomando en consideración sus usos populares los cuales sirven de base para conducir estudios experimentales.⁵





Para el control de moluscos se dispone actualmente de agentes que contienen productos activos químicos. Estos agentes no siempre son satisfactorios en cuanto a su actividad y pueden quedar limitados en cuanto a su capacidad de aplicación debido a los productos activos contenidos en los mismos. Existe por lo tanto, una fuerte necesidad de nuevos agentes molusquicidas biológicos, que presenten una buena actividad, que puedan emplearse de manera sencilla y sin problemas por parte del usuario además de ser amigable con el medio ambiente.

A continuación se muestran conceptos afines al desarrollo trabajo, mismos que ilustran un amplio panorama del mismo.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.

CAPÍTULO 2

ANTECEDENTES



2. ANTECEDENTES

2.1 Productos naturales

Aunque el término “productos naturales” debe tomarse en sentido amplio, es decir, compuestos que se originan en la naturaleza, este término se reserva fundamentalmente a los metabolitos secundarios, cuya función en el organismo no es del todo bien conocida y no son esenciales en su desarrollo. Los seres vivos poseen además otros constituyentes, los llamados principios inmediatos (glúcidos, lípidos, aminoácidos y ácidos nucleicos) procedentes del metabolismo primario e indispensables para su vida. Existen diferentes fuentes de obtención de productos naturales. La de mayor importancia corresponde al mundo biológico terrestre: el reino animal, vegetal, hongos, algas, protozoos y bacterias. Otra fuente importante de obtención de compuestos naturales es el mundo marino que debido a su riqueza en distintos organismos biológicos se está investigando profundamente en la actualidad.¹

La investigación en productos naturales es uno de los medios principales para descubrir compuestos bioactivos, ya sea para aplicaciones farmacéuticas o agroquímicas. Debido a que en ocasiones se desconoce la etiología de muchas patologías, resulta difícil diseñar moléculas potencialmente activas para su tratamiento, de ahí la necesidad de buscar compuestos cabeza de serie a partir de fuentes naturales. De esto puede darnos una idea el siguiente dato: los agentes terapéuticos de origen natural suponen más del 30% de las ventas mundiales. El resurgimiento experimentado por la investigación en este campo va paralelo al desarrollo y disponibilidad de una serie de nuevos bioensayos, por una parte, y de métodos más eficaces de aislamiento, separación, purificación y elucidación, por otra. La velocidad y facilidad con la que los productos naturales pueden ser aislados y caracterizados seguirá aumentando conforme lo haga la automatización de cada una de las etapas, desde el ensayo biológico hasta la determinación estructural.¹



2.1.1 Metabolismo secundario

El metabolismo secundario se puede definir como la biosíntesis, la transformación y la degradación de los compuestos endógenos mediante proteínas de especialización, las cuales se han formado como resultado de los procesos de diferenciación y se clasifican según su significación biológica y función en la célula productora.

Desde el punto de vista botánico, las plantas rastreras contienen menores concentraciones de metabolitos secundarios que las plantas arbóreas. Esta diferenciación se ha hecho evidente en las especies de la familia *Leguminosae*.

2.1.2 Clasificación de los metabolitos secundarios

Atendiendo a las vías biosintéticas que les dan origen, los compuestos secundarios se dividen en tres grandes grupos: los terpenos, las sustancias fenólicas y los compuestos que contienen nitrógeno en su estructura.⁶ Algunas aplicaciones de ellos, se muestran en la tabla siguiente.

Tabla 1. Metabolitos secundarios y algunas de sus aplicaciones

Metabolito Secundario	Aplicación
Aminas	En variedad de compuestos orgánicos (ej. quinolinas son cancerígenas). Muchas veces les confieren actividad fisiológica a la célula animal (ej. histaminas)
Alcaloides	Medicinal. En la fabricación de medicamentos
Esteroles	Medicinal. Forman parte de hormonas animales y vitaminas
Triterpenos	Medicinal e industrial. Son llamados aceites esenciales, útiles en perfumería, farmacia y agroindustria de alimentos
Glicósidos	Medicinal. Estimulan la función cardíaca
Saponinas	Medicinal e industrial. Precursores de hormonas esteroideas y corticosteroides. Por su actividad tensoactiva son útiles como emulgentes y hemolizantes
Fenoles simples	Medicinal e industrial. Poseen actividad antifúngica, desinfectante y aromatizante
Flavonoides	Medicinal e industrial. Reducen fragilidad capilar, protegen en estados tóxicos y anti-inflamatorios. Son colorantes
Taninos	Medicinal e industrial. Propiedades astringentes y antisépticas. Útiles en la fabricación de tintas y otros colorantes, y en el curtido de pieles
Cumarinas	Medicinal e industrial. Anticoagulante y aromatizante





Para entender más a cerca de las vías de formación de los metabolitos secundarios, se describe a continuación su biosíntesis general.

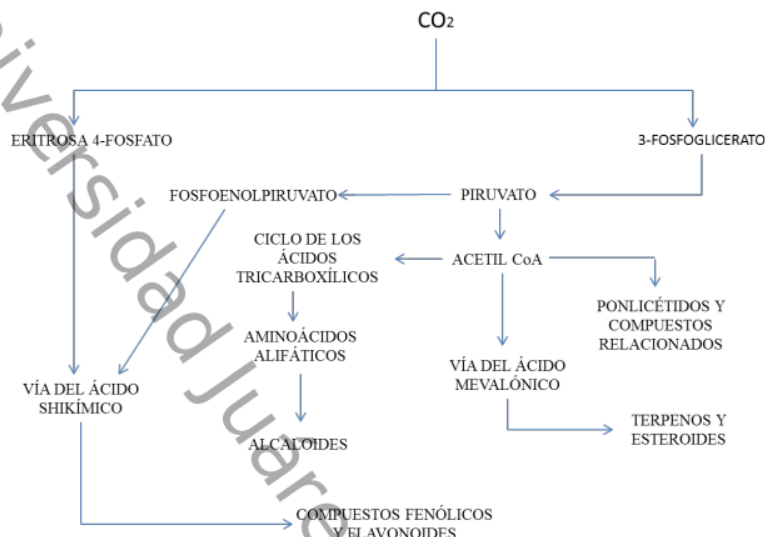
2.1.3 Biosíntesis

Las rutas biosintéticas que forman parte del metabolismo secundario es un tema que en los últimos años ha llamado poderosamente la atención. La síntesis específica de cada compuesto suele estar restringida a estados específicos del desarrollo respectivo de cada tipo de organismo, células especializadas y periodos de estrés causados por la deficiencia de nutrientes o por el ataque de microorganismos.⁶ Este fenómeno se debe a la formación, dependiente de fase, de la correspondiente enzima, lo que significa que la expresión del metabolismo secundario se basa en un proceso de diferenciación.

Muchos factores afectan la síntesis de los metabolitos secundarios, el estado acuífero y la temperatura ambiental son algunos de los más importantes. El metabolismo primario proporciona un gran número de moléculas simples, como el ácido shikímico, el acetato y los aminoácidos, los cuales constituyen los materiales de partida para las rutas biosintéticas del metabolismo secundario.

¹⁵ El ácido shikímico, por la ruta metabólica que lleva su nombre, da origen a muchos compuestos aromáticos, entre ellos los aminoácidos, los ácidos cinámicos y algunas estructuras polifenólicas. El acetato es el precursor de los ácidos grasos y de los policétidos en la ruta del acetato-malonato.⁸





Esquema 1. Vías de formación de los metabolitos secundarios

2.1.4 Alcaloides

Los alcaloides son una gran familia de más de 15,000 metabolitos secundarios que tienen en común tres características: son solubles en agua, contienen al menos un átomo de nitrógeno en la molécula, y exhiben actividad biológica. La mayoría son heterocíclicos aunque algunos son compuestos nitrogenados alifáticos (no cíclicos) como la mescalina o la colchicina, por ejemplo. Se encuentran en el 20% aproximadamente de las plantas vasculares, la mayoría dicotiledóneas herbáceas. A menudo son considerados como metabolitos secundarios de los procesos bioquímicos de las plantas, insectos y anfibios. Los alcaloides en la mayoría de los casos actúan como defensa frente a depredadores y es por eso que se acumulan en la corteza, las hojas, los frutos y para el caso de anfibios e insectos, en la piel.⁹

A continuación se muestran algunos ejemplos de alcaloides derivados de plantas.

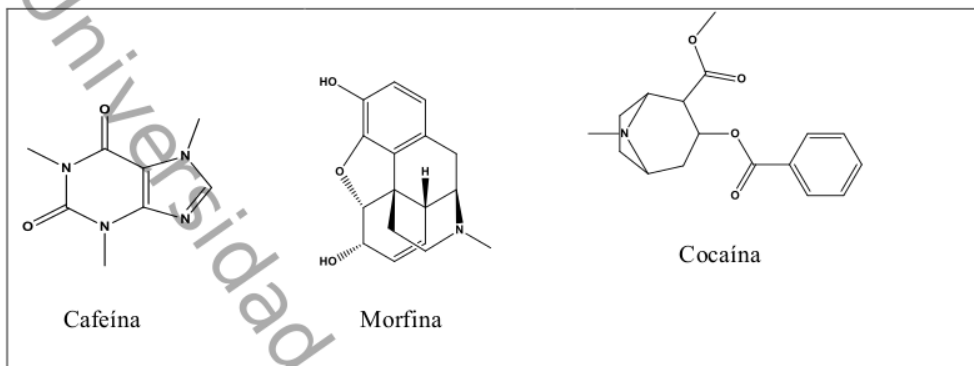


Figura 1. Ejemplos de alcaloides

Se biosintetizan normalmente a partir de lisina, tirosina y triptófano, aunque algunos como la nicotina y compuestos relacionados derivan de la ornitina.¹⁰

2.1.5 Quinonas

Las quinonas son dicetonas cíclicas α,β -insaturadas de estructura tal que se pueden convertir por reducción en hidroquinonas, fenoles con dos grupos hidroxilo en relación 1,2 ó 1,4. Estos compuestos son altamente conjugados debido a eso presentan color y son estables. La fácil interconversión quinona-hidroquinona proporciona un sistema redox muy conveniente que ha sido ampliamente estudiado. Muchas de las propiedades de las quinonas resultan de su tendencia a formar el sistema hidroquinónico aromático.

Numerosas quinonas desempeñan papeles vitales en la bioquímica de las células y los organismos. Ellas ejercen actividades biológicas relevantes, siendo un ejemplo de ello la vitamina K1, que es un factor importante en la coagulación sanguínea y la coenzima Q, una quinona que interviene en la cadena de transporte de electrones en las células.¹¹

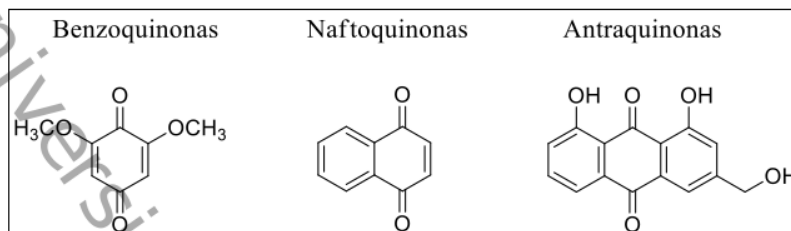


Figura 2. Clasificación de quinonas según su estructura

2.1.6 Esteroides

Son lipoderivados que presentan semejanza estructural con los terpenos o isoprenos, su molécula presenta la estructura básica del compuesto anillado ciclopentano-perhidrofenantreno que corresponde a un conjunto de cuatro anillos entrelazados; tres de los cuales contienen seis átomos de carbono y el cuarto sólo tiene cinco. La longitud y estructura de las cadenas caracteriza a cada uno de los esteroides derivados. Los esteroides que tienen un grupo -OH se denominan esteroleos, el ejemplo más conocido es el colesterol el cual en ciertas células animales llega a constituir más del 50% de los lípidos de membrana y es el más pequeño y menos anfipático de ellos. Debido a que la estructura cíclica del colesterol carece de la flexibilidad de las cadenas alifáticas, se cree que su función sea la de mantener la estabilidad de la membrana a pesar de leves aumentos de temperatura. Las membranas de las células vegetales contienen otros tipos de esteroleos. A continuación se muestra la estructura básica esteroidal.¹²

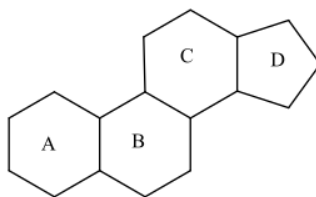


Figura 3. Núcleo ciclopentanoperhidrofenantreno.¹²



2.1.7 Saponinas

Las saponinas son glicósidos que se encuentran distribuidos ampliamente en las plantas y están formadas por una aglicona de origen terpénico, esteroidal o esteroidal alcaloide; al cual se une por el hidroxilo del carbono-3 una cadena ramificada de azúcares, la cual puede ser de hasta cinco moléculas, usualmente glucosa, arabinosa, ácido glucurónico, xilosa y ramnosa. Algunas saponinas tienen adicionalmente un motivo de azúcar, el cual es generalmente glucosa, unido al carbono-26 ó 28. Se considera que la mayoría de las saponinas, los glicósidos cianogénicos y los ácidos hidroxámicos cíclicos son defensas constitutivas de las plantas.¹³

Las saponinas, ya sean esteroidales o terpenoides, son sintetizadas a partir de la vía de los isoprenoides (terpenoides). La biosíntesis de las saponinas se está empezando a comprender gracias al avance en las técnicas para caracterizar proteínas y genes de la ruta biosintética de los terpenoides en células vegetales.¹⁴

La cuantificación de saponinas se ha determinado mediante métodos indirectos tales como la prueba de la espuma, su capacidad hemolítica o la técnica conocida como índice de pescado, sin embargo estos métodos no son muy confiables puesto que pueden dar un falso positivo.¹⁸ El método directo de cuantificación se puede realizar por CLAR o por espectrometría, sin embargo, se tiene el problema de no contar siempre con el estándar requerido para su cuantificación, de manera que se debe proceder a la laboriosa actividad de su purificación.¹⁵

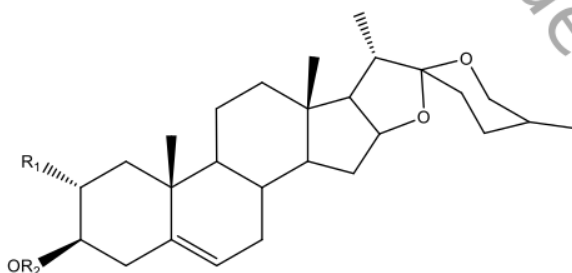


Figura 4. Ejemplo de Saponina.



2.1.8. Flavonoides

El término flavonoides denota un grupo muy amplio de compuestos polifenólicos caracterizados por una estructura benzo- α -pirano, los cuales están ampliamente distribuidos en el reino vegetal y se encuentran de forma universal en las plantas vasculares, en forma de glicósidos. Son muy importantes para el desarrollo y buen funcionamiento de las plantas, ya que actúan como atrayentes de animales en la oviposición, como agentes protectores contra la luz UV o contra la infección por organismos fitopatógenos; además, éstos compuestos presentan propiedades relacionadas con la salud humana, lo cual está basado en su actividad antioxidante.

Químicamente, estas sustancias son de naturaleza fenólica y se caracterizan por poseer dos anillos aromáticos bencénicos unidos por un puente de tres átomos de carbono, con la estructura general C6 -C3 -C6 , los cuales pueden formar o no un tercer anillo.¹⁶

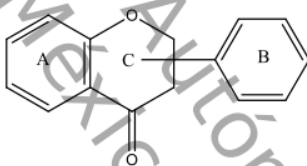


Figura 5. Estructura básica del esqueleto flavonólico

Biosintéticamente son de origen mixto, pues el anillo A proviene de la ruta de la malonilcoenzima A, mientras que los anillos B y C provienen de la ruta del ácido shikímico. Para su estudio sistemático, los más de 4000 flavonoides descritos hasta ahora se han clasificado en varios grupos de acuerdo con las variantes estructurales que presenta el anillo C. Según esto, los flavonoides se clasifican en flavonas, flavonoles, antocianidinas, catequinas, epicatequinas, auronas , isoflavonas y chalconas.¹⁷



2.1.9 Taninos

El nombre tanino se deriva del francés tanin y este del germánico tan, o tanna, que es el nombre con el cual los franceses designaban las cortezas empleadas para el curtido de pieles, según el farmacéutico Andrés Izaguirre.¹⁸

Son sustancias de origen vegetal y de estructura polifenólica, peso molecular entre 500 y 3000; son amorfas, de sabor astringente, solubles en agua, en alcohol y en acetona en forma de soluciones coloidales, pero su solubilidad depende del grado de polimerización, son insolubles en solventes apolares; por su capacidad de precipitar proteínas, se usan para curtir la piel.

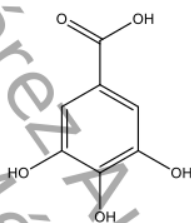


Figura 6. Estructura del ácido gálico

Se encuentran repartidos en la mayoría de las especies vegetales, especialmente en familias como: *Coniferae*, *Ericaceae*, *Leguminosae*, *Myrtaceae*, *Poligonaceae*, *Posaceae*, *Rubiaceae*, *Fagaceae*, *Fabaceae*, etc.

¹ Los taninos, dada su composición, dan por hidrólisis total una molécula de hidrato de carbono y un número más o menos grande de moléculas de ácido gálico. Además puede hallarse algo del ácido digálico. A pesar de que los productos de desdoblamiento son sencillos, el establecimiento de la fórmula es dificultoso, porque los taninos no son uniformes en su composición y están formados por una mezcla de combinaciones muy semejantes entre sí. En este caso como en el de las sustancias macromoleculares, se establece solamente el principio estructural a que obedecen. Por poseer grupos -OH se colorean con las sales férricas, los galotaninos y elegitaninos dan coloración azul-negro, mientras que los taninos catéquicos dan coloración marrón-verdoso.¹⁹



La mayoría de los compuestos fenólicos no se encuentran en estado libre en la naturaleza, sino en forma de ésteres o heterósidos, siendo por lo tanto solubles en agua y en solventes orgánicos polares. Por ser fenólicos, los taninos son muy reactivos químicamente, forman puentes de hidrógeno intermoleculares.²⁰ Se clasifican en hidrolizables y condensados y son descritos a continuación.

2.1.9.1 Taninos hidrolizables

Son ésteres de ácidos fenólicos y de osas, se denominan así por ser fácilmente hidrolizables por ácidos, bases, o enzimas. Antiguamente se les llamaban taninos pirogálicos, porque procedían del pirogalol, por destilación seca. Se diferencian dos grupos, los galotaninos y los elagitaninos.¹⁹

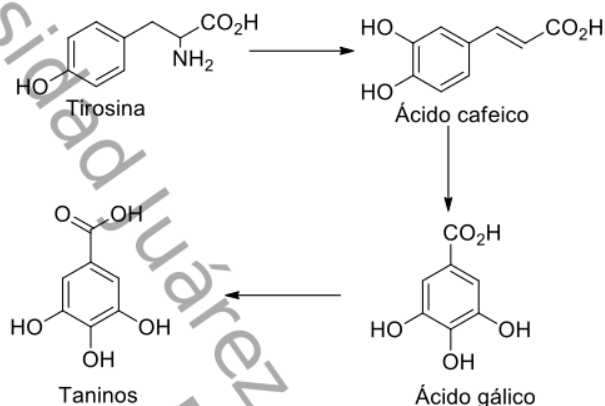
2.1.9.2 Taninos no hidrolizables, condensados o catéquicos

Son derivados de unidades de flavan-3,4-dioles (leucoantocianidinas o proantocianidinas monómeras), conocidos actualmente también como proantocianidinas condensadas. Estas sustancias no son hidrolizables por los ácidos ni por las enzimas. Los ácidos fuertes en caliente o los agentes de oxidación los convierten en sustancias rojas u oscuras, insolubles en la mayor parte de los solventes, llamados “flobafenos”. Estos taninos no son derivados del ácido gálico sino que derivan de los catecoles, a los que se los considera protaninos. Poseen estructura relacionada con los flavonoides y por ser no glucídicos son poco solubles en agua y en lugar de hidrolizarse cuando se los hace hervir en ácido diluido, se transforman en producto de condensación. Las catequinas se consideran precursores de los taninos condensados. Los taninos presentes en las uvas son catequinas y sobre todo leucoantocianidinas.²⁰



En general, los taninos pueden biosintetizarse de la siguiente manera:

2.1.9.3 Biosíntesis de taninos



Esquema 2. Biosíntesis general de taninos

En la biosíntesis de taninos (esquema 2), éstos se pueden obtener partiendo de una estructura de tirosina, hidroxilando y sustituyendo el grupo NH₂ y con esto se obtiene el ácido cafeico, que posteriormente se hidroxila y se forma ácido gálico, que finalmente es transformado en un tanino. Los taninos son polímeros de unidades monoméricas de fenoles, el fenol contiene un anillo aromático con uno o más grupos hidroxilo. El hidrógeno puede ser sustituido con derivados funcionales, como ésteres, metil ésteres, glucósidos, entre otros. No obstante, debido a los problemas asociados con el aislamiento y purificación de taninos, la estructura exacta de estos compuestos aún no se ha dilucidado del todo. Los taninos comprenden uno de los grupos más amplios y diversos de metabolitos secundarios, las plantas varían cualitativamente en su síntesis, como respuesta a cambios ambientales y fisiológicos.²¹

El estudio de los metabolitos secundarios descritos anteriormente están estrechamente relacionados con la malacología y la fasciolosis bovina que se mencionan más adelante en el presente trabajo.



2.2 Malacología

La Malacología está considerada como la ciencia que estudia todos los aspectos relacionados con moluscos (gasterópodos y bivalvos) y que pueden estar incluidos en ciclos de vida de parásitos del hombre y otros animales; comprende aspectos sistemáticos y taxonómicos de las especies que actúan como huéspedes intermediarios, así como de morfología, fisiología, ecología, distribución geográfica, factores que regulan la infección con tremátodos y nemátodos, y la identificación de los estadios larvarios que se desarrollan dentro de estos moluscos. También incluye los aspectos relacionados con métodos de colecta y establecimiento de cultivos, y ciclos biológicos en condiciones de laboratorio y el control químico, biológico, ingenieril e integral.²²

2.2.1 La Fasciolosis hepática

La Fasciolosis es una enfermedad parasitaria que se debe a la presencia y acción del tremátodo *Fasciola hepatica* (Figura 9) en el parénquima y conductos biliares de bovinos, ovinos, caprinos, cerdos, equinos, conejos, venados, hombres y otros animales silvestres. En general es un proceso crónico que produce trastornos digestivos y de nutrición.²³



Figura 7. *Fasciola* adulta

El estudio de los platelmintos o comúnmente conocidos como vermes (gusanos) aplanados es objeto de reflexión de la helmintología. Una de las especies más conocidas por su importancia económica es la denominada *F. hepatica* o gran duela del hígado con distribución geográfica cosmopolita y ciclo de vida complejo. Trematodo de 20 a 50 mm de largo por 6 a 12 mm de ancho que reside en los conductos biliares del huésped definitivo.²⁴



Para que exista una infección por fasciolosis en el ganado bovino, se tiene que reproducir el parásito que causa el daño en las vías biliares, y ello tiene lugar en el caracol de agua dulce, que habita en terrenos húmedos y el cual es descrito a continuación.

2.2.2 Hospedero Intermediario

El hospedero intermediario de *F. hepatica* se encuentra limitado a caracoles de la familia *Lymneidae*, para el estado de Tabasco es *G. cubensis* (figura 8).



Figura 8. *Galba cubensis*

13

Estos caracoles son anfibios, viven en barro húmedo o lugares de agua poco profunda, no estancada y pueden producir hasta 3,000 huevos por mes. En condiciones de sequía o frío, tanto el caracol como los estadios intermediarios, disminuyen su actividad metabólica pudiendo sobrevivir varios meses para reaparecer cuando las condiciones les resulten favorables.²⁵

En 1994 se reporta la prevalencia de *F. hepatica* en las regiones del estado de Tabasco (principalmente en los meses de mayo, junio, julio y octubre), la cual ha ocasionado importantes pérdidas económicas para el sector agropecuario del Estado y cuyo grado de infección depende de acuerdo a las estaciones del año.^{26 27}



2.2.3 Ciclo biológico de *Fasciola*

El ciclo inicia cuando los huevos que pone en los conductos biliares salen al exterior con las heces fecales y, en lugares húmedos, se desarrollan hasta dejar libre una fase ciliada llamada miracidio. Este estado del parásito es muy poco resistente, por lo que necesita penetrar cuanto antes (no más de 24 horas) en pequeños moluscos de agua dulce que, en su mayoría, pertenecen a la familia *Lymneidae*. En el interior de dicho molusco, el parásito prosigue su desarrollo, pasando por los estadios de esporocistos, redia madre, redia hijas, hasta transformarse en una fase más evolucionada con larga cola llamada cercaria. Cuando esta última madura, abandona el caracol, pierde la cola y se le denomina metacercaria, y se enquista primordialmente en la vegetación circundante o en la superficie del agua.^{23, 28} En este estadio, el parásito permanece allí en espera de que la planta a la que está adherido sea ingerida (o el agua bebida) por los animales o el hombre, en cuyo interior se convierte nuevamente en una *F. hepatica* adulta (Figura 7).

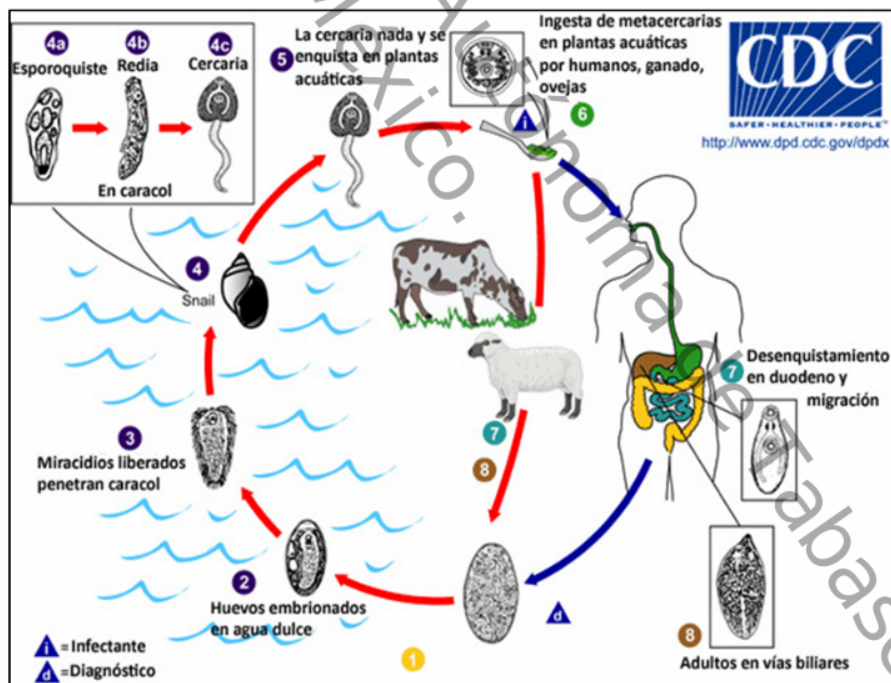


Figura 9. Ciclo biológico de la *Fasciola hepatica*.²⁹





Entre los principales factores que determinan la epidemiología de este parásito, destacan, a nivel biótico, la presencia de caracoles susceptibles que actúan como hospederos intermediarios, la densidad, la edad, la alimentación y el factor de condición de los hospederos intermediarios y definitivos, la presencia de especies de animales que ejercen una interferencia significativa y que impiden la infección del caracol por miracidios de *F. hepatica*.^{23, 28}

2.3 *Laguncularia racemosa*

²²
L. racemosa (L.) Gaertn. F., conocido como el mangle blanco, es un árbol de los manglares en las costas tropicales y subtropicales de América del Norte y del Sur, a la vez que África occidental (tabla 2). Su madera se usa principalmente para combustible, y sus hojas y corteza son una fuente de taninos.³⁰

Es un arbusto o árbol generalmente pequeño de hasta 20 metros de alto por 60 cm de diámetro. Su tronco es recto con ramas ascendentes, copa redondeada y densa. Las ramas jóvenes son ligeramente aplanadas de color pardo moreno. Su madera no es durable, es medianamente pesada y difícil de trabajar por su tendencia a deformarse y rajarse. Su corteza externa es gris oscura a rojiza y se parte en pequeñas placas. La corteza interna es de color ⁵rosa a rojo oscuro, cambia a pardo rojizo y exuda un líquido rojizo. La parte interna del tronco (albura) es de color pardo amarillento o crema rojizo.

Las hojas del mangle blanco son opuestas, elípticas y redondeadas tanto en la base como en el ápice, llegan a medir desde 4 a 10 cm de largo por 2 a 4 cm de ancho; la parte superior de la hoja (haz) es verde oscuro brillante y la parte inferior (envés) es verde amarillento. La base de las hojas (pecíolo) mide de 4 a 15 mm y posee un par de glándulas cerca de la base de la lámina. La hoja tiene numerosas glándulas hundidas en el envés de la lámina que pueden verse fácilmente a contra luz.

Sus flores crecen en grupos en la punta de ramillas en las axilas de las hojas o al final de las ramas jóvenes. En conjunto flores y ramillas se conocen como inflorescencias y miden de 3 a 7 cm de largo. Las flores masculinas y las femeninas se desarrollan en diferentes individuos



(especie dioica). Las partes externas de la flor se fusionaron formando un tubo (hipanto) con cinco lóbulos o dientes triangulares de aspecto de cera de 2 a 3 mm. Al final del tubo nacen cinco pétalos diminutos blancos y redondeados de 1 mm de largo.

Es de los únicos mangles que pueden propagarse vegetativamente, por lo que se usa para cercas. Las técnicas de acodo han resultado en la producción exitosa de raíces y raicillas después de 5 a 6 meses. Sin embargo, los mangles blancos generados por semilla crecen por encima de los rebrotes después del tercer año de crecimiento.³¹

2.3.1 Información taxonómica

Reino: *Plantae*

División: *Magnoliophyta*

Clase: *Magnoliopsida*

Orden: *Myrtales*

Familia: *Combretaceae*

Género: *Laguncularia*

Especie: *Laguncularia racemosa*



Figura 10. *Laguncularia racemosa*

2.3.2 Distribución mundial

El mangle blanco existe en el oeste de África desde Senegal a Camerún, en las Bermudas y en América en ambas costas desde Florida y el norte de México hasta Brasil y Ecuador, las Islas Galápagos y hasta el noroeste de Perú.³¹

2.3.3 Distribución en México

En México habita en ambas costas, desde Tamaulipas a Yucatán por el lado del Golfo y desde Baja California y Sonora hasta Chiapas por el Océano Pacífico. Actualmente, debido a que los bosques de mangle han sido reemplazados por otros usos del suelo, se encuentra en



manchones aislados en las costas de los estados de Tamaulipas, Veracruz, Tabasco, Campeche, Yucatán y Quintana Roo. En el Pacífico desde Baja California Sur, Sonora, Sinaloa, Nayarit, Jalisco, Colima, Michoacán, Guerrero, Oaxaca y Chiapas.³²

2.4 Análisis PROBIT

El procedimiento PROBIT calcula las estimaciones de máxima verosimilitud de los parámetros de regresión y la tasa de respuesta natural para los datos de respuesta desde cuánticos, ensayos biológicos u otros datos de eventos discretos. Este procedimiento mide la relación entre la intensidad de un estímulo y la proporción de casos que presentan una cierta respuesta a dicho estímulo. Es útil para situaciones en las que se dispone de una respuesta dicotómica que se piensa puede estar influenciada o causada por los niveles de alguna o algunas variables independientes, y es particularmente adecuada para datos experimentales. Este procedimiento permite estimar la intensidad necesaria para que un estímulo llegue a inducir una determinada proporción de respuestas, como la dosis efectiva para la mediana³³

2.5 Toxicidad de las plantas medicinales

Así como las plantas tienen el potencial curativo de ciertas dolencias y enfermedades, también poseen el potencial de producir daño, toxicidad y muerte. Por lo tanto, es de vital importancia desarrollar estudios que permitan determinar los efectos tóxicos y las dosis correspondientes. Así mismo, se puede aprovechar tales efectos tóxicos en el control de plagas, por ejemplo ya que es mejor en cuanto al factor monetario y ecológico en comparación con químicos sintéticos.

2.5.1 Dosis tóxica: Es la cantidad de droga que puede producir daño permanente o pasajero en el individuo, el grado de toxicidad guarda relación con la naturaleza de la droga administrada, y esta puede presentarse en forma: aguda, subaguda y crónica. Una sustancia potencialmente supra-tóxica necesitará concentraciones muy pequeñas para producir daño, incluso, muerte.



2.5.2 Dosis letal: La dosis letal, también por sus siglas en inglés LD (*lethal dose*), es una forma de expresar el grado de toxicidad de una sustancia o radiación. Como la resistencia a una sustancia o una radiación puede variar de un sujeto a otro, se expresa como la dosis tal a la que de una población de muestra dada, un porcentaje dado muere.

2.5.3 Dosis letal 50: Es la dosis que produce la muerte del 50% de la población de animales en determinado número de días.

2.5.4 Dosis letal 90: Es la dosis que produce la muerte del 90% de la población de animales en un determinado número de días.

2.5.5 Tiempo letal: Es el tiempo en el cual se obtiene la dosis letal de una población.

2.5.6 Tiempo letal 50: Es el tiempo en el cual se obtiene la dosis letal 50.

2.5.7 Tiempo letal 90: Es el tiempo en el cual se obtiene la dosis letal 90.

CAPÍTULO 3

JUSTIFICACIÓN



3. JUSTIFICACIÓN

En el Estado de Tabasco la Fasciolosis bovina ocasiona importantes pérdidas económicas, el único hospedero intermediario registrado hasta el momento es *G. cubensis*. Dicha enfermedad afecta no sólo al ganado, sino también a otros animales silvestres, y al hombre mismo.

Estudios parasitológicos y epidemiológicos han demostrado que eliminando al molusco vector se puede controlar o eliminar la enfermedad. Dentro de los métodos de control de moluscos el más desarrollado es el químico. Sin embargo, el elevado costo de estos productos, así como su toxicidad para el medio ambiente, han hecho que en la actualidad los trabajos se orienten hacia los productos de origen vegetal. Se pueden señalar como ventajas en su uso que son selectivamente activos, biodegradables, baratos y fácilmente disponibles en las áreas afectadas por la fasciolosis.

El control de caracoles en terrenos donde se cría ganado bovino es de gran importancia agronómica, debido a que éstos pueden hospedar al parásito causante de severa afecciones en el ganado. La especie *G. cubensis* es uno de los moluscos más frecuentes y dañinos, debido a su capacidad de reproducción. El mayor problema consiste en que los principales productos usados en su control, como el metaldehído y metiocarb, no son permitidos como residuos agrícolas en muchos países. Estos productos además amenazan fuertemente a organismos no objetivos como mascotas y pájaros.³⁴

Es por lo anterior que en la UJAT, se ha investigado diversas especies vegetales endémicas en el estado de Tabasco, que sean específicamente tóxicas hacia *G. cubensis*, a fin de emplearlas como una opción ecológica para romper el ciclo biológico natural de *F. hepatica* al eliminar a su hospedero natural.^{2a, 26-27, 35} Sin embargo, en dichos trabajos no se han desarrollado análisis fitoquímicos rigurosos para relacionar los metabolitos identificados con la toxicidad evaluada.

En la DACB se han desarrollado un conjunto de proyectos de investigación encaminados hacia la identificación de metabolitos secundarios en distintas especies vegetales típicas del Estado. Esta experiencia nos sirve para desarrollar análisis fitoquímicos con la mayor precisión.



A partir del año 2011, en la UJAT se está desarrollando un proyecto multidisciplinario de investigación (donde convergen investigadores de área de la biología, la química y la agronomía) que aborda la problemática de la Fasciolosis bovina en Tabasco. En dicho proyecto una parte primordial del mismo propone emplear extractos de *L. racemosa* como una opción ecológica para romper el ciclo biológico de *F. hepatica* (al eliminar a su hospedero natural *G. cubensis*, y de esta forma disminuir la incidencia en el sector agropecuario.

Basándonos en lo anterior, se decidió obtener tres extractos de dicha planta, con la finalidad de identificar los metabolitos secundarios presentes y probar la eficiencia de éstos en el control del molusco vector. Se requiere encontrar al extracto al cual se le atribuya el efecto molusquicida, tomando en cuenta que esta planta ha presentado tal actividad sobre la especie, sin la ventaja de saber de manera exacta cuales metabolitos están presentes y en qué cantidad. Es por ello que decidimos plantear los siguientes objetivos.

CAPÍTULO 4

OBJETIVOS

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.



4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Realizar extractos de *L. racemosa* y evaluar la toxicidad de cada uno sobre *G. cubensis*.

4.1.1 Objetivos particulares

- Obtener los extractos hexánico, clorofórmico y metanólico de *L. racemosa* mediante la técnica de maceración.
- Determinar parámetros fisicoquímicos de las hojas de la *L. racemosa*.
- Realizar un análisis fitoquímico cualitativo preliminar de cada extracto.
- Determinar el TL-50 y TL-90 sobre *G. cubensis*
- Determinar la DL-50 y DL-90 sobre *G. cubensis*.

CAPÍTULO 5

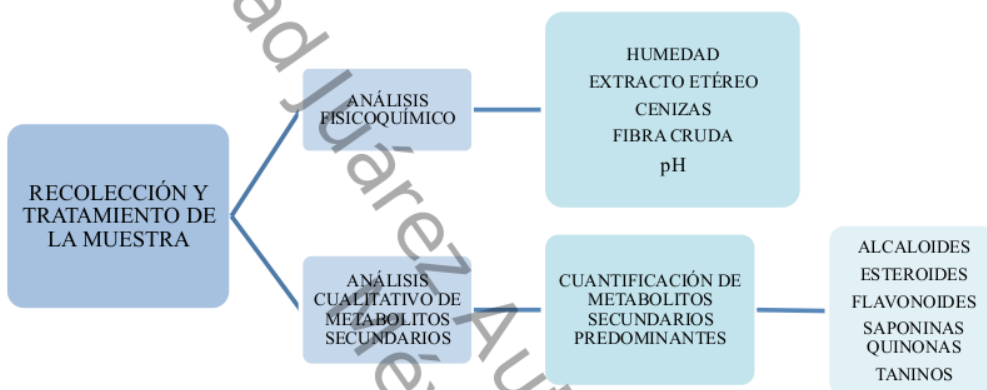
METODOLOGÍA

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.



5. METODOLOGÍA

Se utilizó metodología recomendada en la Farmacopea herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos³⁶ con ligeras modificaciones.



Esquema 3. Metodología

Las hojas de *L. racemosa* se recolectaron en el municipio de Paraíso, Tabasco; específicamente en el poblado “El Bellote”, ubicado a los 18° 25’26.5” de latitud norte y los 93° 08’45.1” de longitud oeste. La distancia aproximada a la cabecera municipal es de 12 km.³¹

Las hojas se lavan correctamente con la finalidad de retirar impurezas, posteriormente se dejan secar en un espacio sin ventilación ni luz solar durante diez días. Luego se colocan en una estufa a una temperatura de 40°C por 48 horas, para deshidratar en su totalidad. Transcurrido este tiempo, se muelen en una licuadora convencional para la obtención de muestras homogéneas, las cuales se almacenan en frascos ámbar y finalmente se guardan en refrigeración a -2°C.³⁷



5.1 Análisis fisicoquímicos

Todos los análisis se realizan por triplicado.

5.1.1 Humedad

Las hojas frescas se colocan por separado en cápsulas de porcelana y se pesan en una balanza analítica. Después, se colocan en una estufa a una temperatura de 55°C durante 72 horas. Posteriormente se transfieren a un desecador durante 30 minutos y se pesan nuevamente las cápsulas con las muestras desecadas. Para los cálculos se utiliza la ecuación siguiente:

$$\% \text{ Humedad} = (P_2 - P_1) / P_3 \times 100. \dots\dots\dots(\text{Ec. 1})$$

Donde:

P_1 = Peso de la cápsula de la porcelana con la muestra húmeda.

P_2 = Peso de la cápsula de la porcelana con la muestra desecada

P_3 = Peso de la muestra

5.1.2 Cenizas

La muestra se incinera en una mufla a 600°C, para eliminar todo el material orgánico que pueda contener la muestra. El material inorgánico que no es destruido se llama ceniza. Para determinar cenizas, se utiliza una mufla, se emplean 3 crisoles a un peso constante, se agrega a cada crisol 1 g. de muestra de hojas de mangle, se calienta en una parrilla eléctrica bajo una campana de extracción durante 3 horas para carbonizar la muestra, pasado este tiempo se le agregan 3 gotas de HNO_3 a cada crisol, para la obtención de cenizas blancas.

Después de obtener humos blancos, se suspende el calentamiento, se deja enfriar a temperatura ambiente, luego se transfieren a un desecador por 30 minutos, y se calcina a 600°C durante 5 horas. Al término de este tiempo se regresan al desecador por 30 minutos y al final se pesan los 3 crisoles con la muestra calcinada.³⁶





Mediante la siguiente ecuación (Ec. 2) se obtienen los datos del porcentaje de cenizas.

$$\% \text{ Ceniza} = (P_2 - P_1) / P_3 \times 100 \dots\dots\dots(\text{Ec. 2})$$

Dónde:

P_1 = Peso del crisol tarado

P_2 = Peso del crisol con la muestra calcinada

P_3 = Peso de la muestra

5.1.3 Fibra cruda

Se realiza mediante una digestión con ácido sulfúrico al 0.128 M en caliente. Se pesa la muestra y se coloca en un crisol, se le agrega H_2SO_4 , hasta cubrir totalmente y se calienta a ebullición por 30 minutos. Al término del tiempo transcurrido se filtra y se lava con agua destilada caliente. Se le adiciona NaOH 0.223 M y se le agrega octanol como antiespumante. Se calienta a ebullición, después del tiempo de reacción, se retira la muestra para enfriamiento a temperatura ambiente y se trata con acetona utilizando vacío.

Posteriormente, la muestra se transporta a una estufa por 2 horas a 130°C , se saca y se deja en un desecador. Se pasa a una mufla a una temperatura 550°C por 2 horas y luego se coloca de nuevo en un desecador, se pesa la muestra y se calcula el porcentaje de fibra cruda por diferencia de peso.³⁶

5.1.4 pH

El pH es una forma de expresar la concentración de iones hidrógeno en las soluciones. En general se usa para expresar la intensidad de la condición ácida o alcalina de una solución. Se mide el pH de las decocciones realizadas con cada muestra en un pHmetro. Para ello se pesan 3 porciones de 1 g cada uno y se calienta hasta ebullición moderada en 200 mL de agua por 15 minutos; se dejan enfriar a temperatura ambiente y finalmente se lee la acidez de cada muestra.





5.1.5 Salinidad

La salinidad es una propiedad importante del agua. Originalmente este parámetro se concibió como una medida de la cantidad total de sales disueltas en un volumen determinado de agua. Dado que la determinación del contenido total de sales requiere de análisis químicos que consumen mucho tiempo, se utilizan en substitución métodos indirectos para estimar la salinidad. Ésta se puede determinar de acuerdo a ciertos parámetros: conductividad, densidad, ó índice de refracción.

Se toma 1 g del material vegetal y se disuelve en 1000 ml de agua, agitando vigorosamente hasta obtener una sustancia homogénea a la cual se introduce un refractómetro durante 30 segundos y posteriormente se puede ver el resultado, el cual es leído en ppm.

5.1.6 Obtención de los extractos hexánico, clorofórmico y metanólico

La extracción es una técnica de separación y purificación para aislar una sustancia de una mezcla sólida o líquida en la que se encuentra, mediante el uso de un disolvente. Los disolventes orgánicos utilizados en la extracción deben tener baja solubilidad en agua, alta capacidad de solvatación hacia la sustancia que se va a extraer y bajo punto de ebullición para facilitar su eliminación posterior.

16

Cuando se trata de una muestra sólida, se pulveriza y a continuación, se extraen los analitos mediante un disolvente en el que sean muy solubles, que los diferencie de las sustancias presentes en la matriz, que han de ser muy insolubles en ese disolvente.

Las extracciones se realizan de la siguiente manera: Se colocan en maceración dos matraces de 2000 ml con 100 gramos cada uno de las hojas molidas y deshidratadas de *Laguncularia racemosa* y se cubren con hexano por 72 horas a temperatura ambiente. Una vez concluido este tiempo, se filtra al vacío y la solución orgánica se evapora a presión reducida en rotavapor.

Posteriormente se elimina totalmente el disolvente en una bomba de alto vacío. A este residuo lo denominamos *extracto hexánico*. Finalmente es etiquetado, sellado y guardado a una temperatura de -2°C.



Una vez retirado el hexano del material vegetal, se le adicionan 400 ml de cloroformo, dejando nuevamente en maceración durante 72 horas, a temperatura ambiente. Al extracto obtenido le denominaremos *extracto clorofórmico*. Finalmente, se realiza el mismo procedimiento, sólo que ahora con metanol, para obtener así el *extracto metanólico*. En total se realizan diez maceraciones con 100 gramos de *L. racemosa* en cada matraz.

5.2 Análisis cualitativo de metabolitos secundarios.

Los análisis fitoquímicos se realizan para identificar los principales grupos de metabolitos presentes como por ejemplo: alcaloides, flavonoides, saponinas, quinonas y esteroides y/o terpenos (triterpenoides). Las pruebas se realizan por triplicado y consisten en la determinación cualitativa de los diferentes metabolitos, los extractos obtenidos entran en contacto con diferentes reactivos químicos y se observan las reacciones de coloración y/o precipitación que indica la presencia o ausencia de los diferentes.³⁸

A los tres extractos obtenidos (hexánico, clorofórmico y metanólico) se les realizan los siguientes ensayos por triplicado.

5.2.1 Identificación de alcaloides.

En un tubo de ensayo se colocaron 2 ml de extracto y 6 ml de ácido clorhídrico al 10 % v/v, se calienta la mezcla a ebullición durante 5 minutos. Se deja enfriar y se coloca la muestra en dos tubos de ensayo.

Tubo 1: testigo.

Tubo 2: se adiciona una gota del reactivo Dragendorff para detectar alcaloides.

Si existe una turbidez o precipitación naranja, se considera positivo para alcaloides.¹

5.2.2 Reconocimiento de flavonoides.

Se disuelve 1ml de extracto en 2 ml de etanol y se divide en dos tubos:

Tubo 1: testigo.

Tubo 2: Se adiciona por las paredes ácido clorhídrico concentrado y fragmentos de virutas de magnesio metálico.

Si aparece una coloración amarilla, verde, roja o azul violeta, se comprueba la presencia de flavonoides.



5.2.3 Reconocimiento de saponinas.

En un tubo de ensayo se colocan 4 ml de filtrado acuoso y se agita vigorosamente durante un minuto. La formación de una espuma abundante y estable es prueba presuntiva de la presencia de saponinas.

5.2.4 Quinonas.

En dos cápsulas de porcelana con 2 ml de extracto se concentran a sequedad.

Tubo 1: testigo

Tubo 2: se adicionan 3 gotas de ácido sulfúrico concentrado.

Si se observa una coloración roja intensa, indica la presencia de quinonas.

5.2.5 Taninos.

En un tubo de ensayo se agrega 1 mL de extracto, 2 ml de agua destilada y 3 gotas de cloruro de sodio NaCl al 2% w/v, la muestra se calienta a ebullición durante 1 minuto, se enfría y filtra. El filtrado se divide en dos tubos de ensayo.

Tubo 1: testigo

Tubo 2: Se adiciona 1 gota de cloruro férrico al 1% w/v.

La formación de coloración azul a negro indica la presencia de derivados del ácido gálico, los taninos condensados muestran una coloración verde en esta prueba.

5.2.6 Terpenos (triterpenoides) y/o esteroides.

En dos tubos de ensayos limpios y secos se coloca 1 ml de extracto.

Tubo 1: testigo

Tubo 2: Se adiciona 1 ml del reactivo de Liebermann-Buchard.

La aparición de una coloración azul o verde es positiva para esteroides, mientras que una coloración violeta-rojo indica la presencia de triterpenoides³⁷



5.3 Cuantificación de los metabolitos predominantes

Las cuantificaciones se realizaron en un espectrofotómetro de UV-visible, marca CARY 300 Conc. De manera triplicada.

5.3.1 Cuantificación de saponinas

Se toma 1.0 g del material vegetal y se transfiere a un matraz Erlenmeyer de 500 ml que contenga 100 ml de agua en ebullición. Se mantiene en ebullición suave durante 30 minutos. Se enfría y filtra la muestra en un matraz volumétrico de 100 mL. Posteriormente se adiciona suficiente agua a través del filtro para llevar al aforo.

Se divide la decocción en 10 tubos con tapa (16 cm de alto y 16 mm de diámetro) en porciones sucesivas desde 1.0 ml hasta 10 ml y ajustamos el volumen del líquido en cada tubo con agua hasta 10 ml.

Los tubos se tapan y se agitan durante 15 segundos (dos agitaciones por segundo a lo largo del tubo). Se deja reposar la muestra durante 15 minutos y se mide la altura de la espuma.

Los resultados se determinan de la siguiente manera:

- Si la altura de la espuma en cada tubo es menor de 1.0 cm, el índice de espuma es menor que 100.
- Si se puede medir la altura de la espuma de 1.0 cm en algún tubo, el volumen de la decocción del material vegetal en este tubo (a) se usa para determinar el índice. Si este tubo es el primero o el segundo de la serie, preparar de manera similar una dilución intermedia para obtener un resultado más preciso.
- Si el tamaño de la espuma es mayor de 1.0 cm en cada tubo, el índice de espuma es mayor que 1000. En este caso repetir la determinación usando una nueva serie de diluciones de la decocción para obtener un resultado más preciso.

Para el cálculo del índice de la espuma se usa la siguiente fórmula: $1000/a$, donde "a" es el volumen en mililitros de la decocción usada para preparar la dilución en el tubo donde la espuma tiene la altura de 1.0 cm.³⁶



5.3.2 Cuantificación de taninos

La cuantificación de taninos se realiza de acuerdo al método ISO: 9648 (1988), usando como referencia al ácido tánico. Para esto se pesa 1 g de muestra base seca previamente desengrasada en un tubo de ensayo de 50 ml. Se adicionan 20 ml de solución de dimetilformamida al 75% v/v y se agita por 60 minutos a lo largo del tubo.

Después se centrifuga a 1000 rpm durante 10 minutos; se toma 1 ml de sobrenadante y se coloca en un tubo de ensayo (A), se agregan 6 ml de agua destilada y 1 ml de solución amoniacal (8,98 ml/L) y se agita suavemente. En otro tubo (B) se añade 1 ml de sobrenadante, 5 ml de agua, 1 ml de citrato férrico (3.5 g/L), se mezcla bien y se agrega 1 ml de solución amoniacal. Se deja reposar por 10 minutos.

A continuación se transfieren las soluciones de los tubos a una celda de medición y se leen a 525 nm contra un blanco de agua. El resultado es la diferencia de las absorbancias. Para construir la curva de calibración, se prepara una solución de ácido tánico al 1%, ésta utilizada como estándar, de la cual se pasan 0, 1, 2, 3, 4 y 5 ml respectivamente en seis matraces volumétricos de 100 ml y se aforan.

Posteriormente se toma 1 ml de cada una de estas soluciones y se coloca por separado en tubos de ensayos, añadiendo sucesivamente 5 ml de agua y 1 ml de solución de citrato férrico, se mezcla por unos segundos, después se añade a cada muestra 1 ml de solución y se agita. Se espera el desarrollo de color por 15 minutos y finalmente se transfieren las soluciones a una celda de medición del equipo para ser leídas las absorbancias. Los datos obtenidos se grafican, las absorbancias se registran en las ordenadas y las concentraciones de ácido tánico en las abscisas, expresadas en mg/ml.

Para efectuar los cálculos se utiliza la ecuación de la recta $y = mx + b$.

Donde “y” es la absorbancia, m la pendiente, “b” la intersección y “x” la concentración en mg/ml, por lo que despejando x, se obtiene la concentración de cada muestra, los valores obtenidos se sustituyen en la siguiente ecuación:



$$\% \text{ TANINOS} = (C \times 100) / F \dots\dots\dots(\text{Ec. 3})$$

En donde C = concentración de ácido tánico en mg/ml; y

F = factor de dilución = peso de muestra en mg/20 ml de solución = 50 mg/ml ³⁷

5.3.3 Cuantificación de esteroides

Esta determinación se realiza de la siguiente manera: El extracto hexánico obtenido, se reconstituye con 2 ml de cloroformo absoluto del cual se toman 50 μL (0.05 ml) y se colocan en un tubo de ensayo de 10 ml, se adicionan 450 μL (0.450 ml) de cloroformo absoluto y 5 ml de reactivo de Liebermann-Buchard. Se tapa el tubo y se sumerge en baño de agua a 35°C por 10 minutos para desarrollo de color.

Se prepara la curva de calibración de la siguiente manera: se utilizan cinco tubos de ensayo de 10 ml cada uno. En el primero de ellos se adiciona cloroformo absoluto para ser usado como blanco de reactivo y en los otros cuatro, 0.5 ml de cloroformo a 0.5 ml de las soluciones de colesterol en concentraciones: 0.5, 1.0, 2.0 y 4.0 mM respectivamente en cloroformo absoluto, después se agregan a cada tubo 5 ml del reactivo de Liebermann-Buchard; se tapan y se ponen en baño de agua A 35 °C por 10 minutos.³⁶

El colesterol es utilizado como estándar para la lectura de las muestras. Finalmente se obtienen las absorbancias para cada uno de los tubos, contra blanco de reactivo, a una longitud de onda de 550 nm.

5.3.4 Cuantificación de flavonoides

Para la cuantificación de flavonoides se utilizan 0.5 g de extracto, y se realiza de la siguiente manera.

Para preparar la solución de referencia, se pesan 10 mg de hesperidina y se disuelve en metanol absoluto llevando al aforo en un matraz de 10 ml.



A partir de la solución madre y la referencia, se preparan otras cuatro soluciones de la siguiente forma:

Solución 1. Se colocan 2 ml de la solución madre y 2 ml de cloruro de aluminio al 2% m/v en un matraz aforado de 25 ml y se lleva al aforo con metanol absoluto.

Solución 2. Se colocan 2 ml de la solución madre en un matraz aforado de 25 ml y se lleva al aforo con metanol absoluto.

Solución 3. Se toma 2 ml de la solución de referencia y 2 ml de cloruro de aluminio al 2% m/v en un matraz aforado de 25 ml y se afora con metanol absoluto.

Solución 4. Se depositan 2 ml de la solución de referencia en un matraz volumétrico de 25 ml y se afora con metanol absoluto.

El procedimiento de lectura en el espectrofotómetro, se lleva a cabo de la siguiente manera:

Se mide la absorbancia de la solución 1, después de 25 minutos a 394 nm, usando como blanco la solución 2. Después se mide la absorbancia de la solución 3, transcurridos 25 minutos a 394 nm, usando como blanco la solución 4.

Para calcular el porcentaje de flavonoides se utiliza la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Flavonoide total expresado como hesperidina} = \frac{A_1 P_2 V_2}{A_2 P_1 V_1} (100)$$

En donde:

A_1 es la absorbancia de la muestra;

A_2 es la absorbancia de la preparación de referencia;

P_1 es el peso de la muestra;

P_2 es el peso de la sustancia de referencia;

V_1 es el volumen de aforo de la muestra (250 ml); y

V_2 es el volumen de aforo de la referencia (10 ml).





5.4 Metodología biológica

Las pruebas de toxicidad sobre *G. cubensis* se realizaron en el Laboratorio de Malacología en la División Académica de Ciencias Biológicas de la UJAT.

5.4.1 Colecta de la especie *Galba cubensis*

El método utilizado es colecta libre hasta obtener suficientes caracoles (aproximadamente 700) en etapa adulta. Posteriormente son colocados en tinas de 1m³ las cuales son utilizadas como terrarios con las condiciones de suelo y temperatura adecuados para la supervivencia de *G. cubensis*.

5.4.2 Preparación de terrarios

Se acondicionan terrarios usando platos de plástico de 30 cm de diámetro con 200 g de suelo, los cuales se utilizan para realizar los bioensayos sobre los especímenes bajo las condiciones adecuadas (humedad, temperatura, nutrientes, formación de lama, luz, etc.), de acuerdo a los procedimientos comunes.

5.4.3 Determinación de grupos de estudio

Posteriormente se procede a la selección de los caracoles, tomar en cuenta su tamaño y movimiento con la finalidad de cerciorarse de que son similares en edad para seguir un patrón lo más definido posible. Se seleccionan de diez en diez y se revisan minuciosamente con un estereoscopio para verificar movimientos. Después son colocados en los terrarios en el mismo orden.

5.4.4 Preparación de soluciones

Se toma 1 g de cada extracto (hexánico, clorofórmico y metanólico) y se diluyen en 1 litro de agua corriente, cada uno por separado. De esta manera se obtienen tres soluciones con una concentración igual a 1g/L. El paso anterior se repite para obtener las concentraciones siguientes: 2.5 g/L, 5 g/L, 10 g/L y 20 g/L.



5.4.5 Aplicación de los extractos

Se toman 3 ml de la primera concentración (1 g/L) de cada extracto y se aplican a 15 terrarios que contengan 10 caracoles cada uno y 5 terrarios más son utilizados como testigos, a los cuales no se les aplica nada. Haciendo un total de 200 especímenes expuestos en 96 horas de observación.

Posteriormente se toma la concentración de 20 g/L y se aplica a un lote nuevo de caracoles usando el procedimiento anterior. Lo mismo se realiza con las concentraciones de 2.5 g/L, 5 g/L y 10 g/L. En la aplicación de cada concentración se seleccionan nuevos caracoles para los bioensayos, así también para los testigos.

Después de cada aplicación se dejan pasar dos horas y se revisa minuciosamente cada terrario para saber si hubo mortalidad y realizar las cuantificaciones si es el caso.

El monitoreo de especímenes debe realizarse en un estereoscopio cada dos horas durante todo un día para obtener datos confiables. Después, el monitoreo se realiza cada 8 horas hasta completar 96 ininterrumpidamente. Es importante verificar minuciosamente los movimientos de cada caracol y registrar los resultados oportunamente.

Universidad Juárez
México Autónoma de Tabasco.

CAPÍTULO 6

RESULTADOS Y

DISCUSIONES



6. RESULTADOS Y DISCUSIONES

6.1 Análisis fisicoquímicos

Las pruebas fisicoquímicas realizadas en las partes aéreas de la planta se hicieron por triplicado, éstas fueron: humedad, extracto etéreo, cenizas, fibra cruda y pH. Los resultados se muestran a continuación. (Ver tabla).

Tabla 2. Análisis fisicoquímico realizado en hojas de *L. racemosa*

Parámetros	Determinación	Desviación estándar
Humedad	58%	± 0.31
Extracto etéreo	1.74, 1.96, 6.29%	± 0.08, ± 0.11, 0.14
Cenizas	8.89%	± 0.56
Fibra cruda	3.04%	± 0.23
pH	4.92%	± 0.05

El análisis de humedad se realizó en una estufa marca ROBERTSHAW y se pesó en una balanza analítica AINSWORTH AA-160. En este estudio se observa un porcentaje relativamente bajo en comparación con otros tipos de mangle. Esto es debido a que *L. racemosa* se encuentra a las orillas de ríos y lagunas pero en zonas más altas que *Rhizophora mangle* (mangle rojo) o *Avicennia germinans* (mangle negro), debido a esta distribución diferencial con respecto al agua en que se desarrollan, *L. racemosa* es la especie que soporta menos la inundación continua.

En el proceso experimental para la determinación de extracto etéreo, se utilizaron tres disolventes: hexano, cloroformo y metanol. El disolvente que mejores rendimientos obtuvo en cuanto a la extracción de esteroides fue el hexano, en el que claramente se distinguían las grasas obtenidas, lo que mostraba la presencia de metabolitos secundarios de baja polaridad y pudimos comprobarlo al realizar estudios cualitativos.

Se utilizó el cloroformo como segundo disolvente debido a que es más estable y miscible (en comparación con el hexano), con la mayoría de los compuestos orgánicos lipídicos y saponificables además de ser medianamente polar, por ende, se encontraron metabolitos



secundarios de polaridad media como son flavonoides y saponinas, de las cuales se describen las cuantificaciones más adelante.

En el último extracto obtenido se utilizó metanol, y se obtuvo de la misma forma que los extractos anteriores, por maceración durante 72 h, se eliminó el disolvente en rotavapor y finalmente se pasó la muestra a alto vacío para obtener un extracto totalmente concentrado. A continuación se muestran los pesos en gramos y porcentaje obtenidos de cada extracción (ver tabla).

Tabla 3. Peso en gramos de los tres extractos obtenidos

Extracto	Peso g	%
Hexánico	17.41	1.74
Clorofórmico	19.63	1.96
Metanólico	62.98	6.29

En la tabla anterior se muestra el porcentaje de cada extracto encontrado en *L. racemosa*, mismos que consideramos bajos tomando en cuenta que el peso de la materia prima que se maceró fue un poco alto (un kilogramo de polvo seco de la hoja con tallos finos).

El índice de cenizas totales se considera dentro de los valores normales, en este tipo de planta debido al medio ambiente en el que habita, el cual es halófito y se estima que a esto corresponde que esta planta posea cierto porcentaje de sales, por lo que se considera normal la presencia de compuestos químicos. Comparando el mangle blanco con el mangle rojo (*Rizophora mangle*),³⁹ los niveles de cenizas son más altos, ya que éste último, a pesar de ser una especie que crece en terrenos donde está más expuesto al agua salada, esta especie ha evolucionado, ya que desarrolló lo que parece ser un sistema de filtrado que evita el alto consumo de sales presentes en el agua, posee en sus raíces orificios, aberturas hidrófobas permeables al aire y no al agua, los cuales se abren o cierran de acuerdo al nivel de agua presente, y por tanto sus niveles de compuestos químicos inorgánicos son menores a los de *L. racemosa*.



En el análisis de fibra cruda realizado, se encontró un pequeño porcentaje, esto concuerda con la morfología de las hojas, las cuales son relativamente pequeñas y sus tallos delgados en comparación con otros tipos de mangle, los resultados son mostrados a continuación.

El pH presente en las decocciones es un poco ácido, esto se atribuye a la abundante presencia de polifenoles.

6.2 Análisis cualitativo de metabolitos secundarios

Las determinaciones cualitativas de los metabolitos secundarios se realizaron con reactivos de identificación específicos para cada familia de compuestos, por medio de reacciones coloridas, a excepción de las pruebas para saponinas, las cuales fueron realizadas por la presencia de espuma. Los análisis cualitativos se realizaron por triplicado.

Tabla 4. Identificación de metabolitos secundarios

Metabolitos secundarios	Extracto hexánico	Extracto clorofórmico	Extracto metanólico
Alcaloides	---	---	---
Esteroides y/o Terpenoides	+++	---	---
Flavonoides	---	+	++
Saponinas	---	+	++
Quinonas	---	---	---
Taninos	---	---	+++

Convenciones: Ausencia (-). Poca predominancia (+). Presentes en mediana cantidad (++). Presentes en abundancia (+++).



Figura 11. Metabolitos identificados en *L. racemosa*



En el extracto hexánico, se realizó el análisis para la identificación de esteroides y resultó positivo, se observó una coloración verde intensa característica de la presencia de esteroides. También se realizaron pruebas de identificación para alcaloides en este extracto, donde la coloración de la muestra no cambió, lo que nos mostró es que no contiene este metabolito. En los análisis realizados para determinar la presencia de flavonoides, quinonas, saponinas y taninos la identificación resultó negativa también.

En el extracto clorofórmico se observó una ligera presencia de saponinas, pues el índice de espuma fue poco abundante, y una mínima cantidad de flavonoides. Al igual que en el extracto hexánico, se realizaron pruebas de identificación para alcaloides, esteroides, saponinas, taninos y quinonas y obtuvimos un resultado negativo. Lo que evidenció la ausencia de los metabolitos secundarios mencionados anteriormente.

Con el último extracto obtenido, el cual fue el metanólico, se le realizaron también pruebas de identificación de metabolitos secundarios (alcaloides, flavonoides, saponinas, taninos y quinonas), las cuales son descritas a continuación.

En lo que se refiere a los alcaloides, esteroides, y quinonas no se evidenció presencia alguna. En mediana cantidad pudimos observar la presencia de saponinas, en las cuales observamos que el índice de la espuma era medianamente abundante y persistente en las decocciones. En los resultados del análisis de identificación de flavonoides, obtuvimos una respuesta positiva, ya que presentaron un color amarillo-rojizo en los tubos y con ello se confirmó la presencia de este metabolito.

Finalmente, resulta interesante destacar que en el extracto metanólico se observó claramente la presencia de taninos de manera abundante debido al cambio de color, el cual fue azul muy intenso, lo que indica que son taninos hidrolizables, mismos que son utilizados por la planta como mecanismo de defensa ante el herbivorismo y el ataque por hongos y/o bacterias.



6.3 Análisis cuantitativo de metabolitos predominantes

Se cuantificaron los metabolitos más destacados y los que se encuentran en mediana cantidad, en la planta. Los estudios se realizaron de forma triplicada en un espectrofotómetro marca CARY 300 Conc.

La finalidad de realizar éste análisis, es conocer la concentración de metabolitos secundarios de mayor predominancia presentes en la planta, las cuantificaciones se realizaron por triplicado para cada metabolito mediante procedimientos analíticos y siguiendo la metodología adecuada, así como también los reactivos y equipos para cada tipo específico de análisis. Se calculó el promedio y la desviación estándar. Se utilizaron métodos analíticos espectrofotométricos y se realizaron bajo metodologías previamente utilizadas aprobadas por la FEUM.³⁶

6.3.1 Cuantificación de esteroides

Los esteroides son los metabolitos secundarios con mayor predominancia en el extracto hexánico, y fueron cuantificados espectrofotométricamente, empleando colesterol como estándar de referencia, presentando una correlación de: 0.9928 en la curva de calibración. Los datos para la construcción de la curva fueron los siguientes:

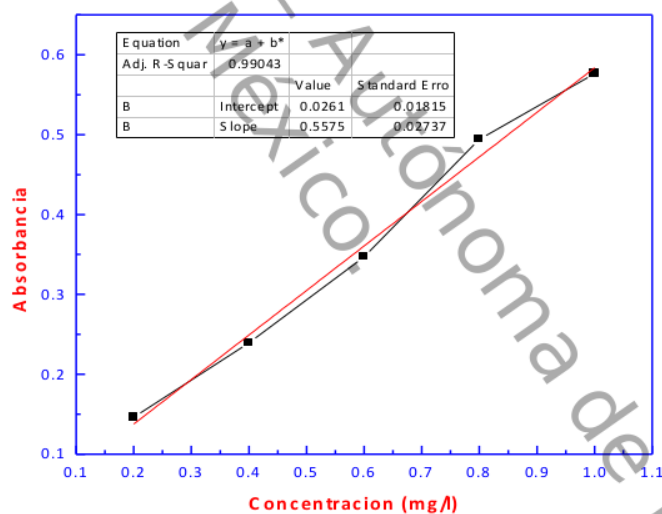
Tabla 5. Valores leídos en la determinación de esteroides

Estándares	Concentración de colesterol mg/L	Absorbancias
Patrón 1	2.0	0.1462
Patrón 2	4.0	0.2395
Patrón 3	6.0	0.3471
Patrón 4	8.0	0.4944
Patrón 5	10	0.5763



Figura 12. Esteroides presentes

Los datos de absorbancias que se obtuvieron en las muestras, se interpolaron en la gráfica para obtener las concentraciones de esteroides expresados en mg/L (gráfica 1).



Gráfica 1. Determinación de esteroides



Tabla 6. Cuantificación de esteroides

Promedio en mg/g	Desviación estándar
1.097	± 0.03

En la tabla anterior (tabla 6) se muestra el contenido de esteroides el cual no es muy alto, se sabe que las plantas por lo regular presentan varios tipos de esteroides en pequeñas cantidades y se cree que estas sustancias actúan como componentes estructurales de las membranas vegetales a la vez que sirven de intermediarios para la biosíntesis de celulosa y numerosos metabolitos secundarios, como los alcaloides, entre otros.⁴⁰

6.3.2 Cuantificación de saponinas

Este metabolito se identificó tanto en el extracto clorofórmico, como en el metanólico, aunque en el primero fue de manera ligera, se mostró mayor presencia en el segundo.

Las saponinas son excelentes agentes emulsionantes, funcionan bien como espumantes. En forma de polvo producen estornudos y están casi exentas de toxicidad por vía oral. Algunas saponinas son marcadamente tóxicas. Estas son llamadas sapotoxinas y tienen una acción hemolítica sobre los glóbulos rojos sanguíneos si son inyectadas directamente por vía intravenosa.

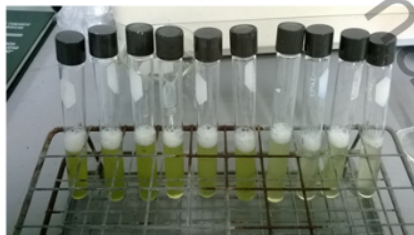


Figura 13. Saponinas identificadas

En la tabla 7 se muestran los resultados obtenidos en la cuantificación de saponinas presentes, de acuerdo al índice de espuma.



Tabla 7. Resultados de saponinas encontradas en el extracto metanólico

No. tubo	Índice de espuma en <i>L. racemosa</i> (cm)
1	0.10 ± 0.00
2	0.24 ± 0.00
3	0.49 ± 0.00
4	0.76 ± 0.04
5	0.92 ± 0.00
6	1.00 ± 0.04
7	1.30 ± 0.00
8	1.50 ± 0.02
9	1.80 ± 0.02
10	2.00 ± 0.02

Después de la agitación de las muestras, se dejaron reposar y se midió el nivel de espuma formada tal como lo marca la metodología, el resultado fue la concentración de saponinas medida en la espuma formada en cada tubo.

Se alcanzaron diferentes alturas, dependiendo de la cantidad de decocción y de agua agregada a cada tubo, cabe mencionar que en los tubos del 1 al 5, se observó un índice de espuma menor a 1 centímetro y en los tubos del 6 al 10, la espuma alcanzó 1 cm y más, se mantuvieron constantes hasta después de una hora. El tubo número 6 se utilizó como unidad para realizar la cuantificación de saponinas presentes, el cual fue mayor que 100.

Tabla 8. Cuantificación de saponinas por índice de espuma

Índice de espuma en <i>L. racemosa</i>
$1000 / 6 = 166.6$

17

Muchas saponinas resultan tóxicas para los moluscos, motivo por el cual en los países tropicales se recurre a ellas como molusquicidas, ya que con ello se rompe la cadena de transmisión de las esquistosomiasis.¹⁴ Únicamente son molusquicidas las saponinas monodesmosidicas, sin embargo las bidesmosidicas se convierten en monodesmosidicas por hidrólisis,⁴¹ es decir en una solución a base de agua pudieran estas saponinas presentes en los



extractos, tener un efecto adverso contra *G. cubensis*, sin embargo, en los resultados encontrados en este trabajo, no se exhiben tales efectos molusquicidas sobre la especie.

6.3.3 Cuantificación de flavonoides

Para la cuantificación de flavonoides presentes en hojas de la planta, se utilizó la técnica reportada en la Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos,³⁶ la cual se adaptó para el tipo de planta utilizada, usando como referencia la hesperidina. En esta cuantificación no fue necesario construir una curva de calibración, pues la metodología utilizada nos indicó que los resultados obtenidos se basaron en las diferencias de las absorbancias entre el patrón y el problema, tal como se describió en la parte experimental. Las absorbancias promedio registradas, se presentan a continuación en la siguiente tabla.

Tabla 9. Valores de las absorbancias detectadas en la determinación de flavonoides

No de solución	Absorbancia
1	0.0471
2	0.0333
3	0.0382
4	0.0734

Los resultados que se obtuvieron en la lectura de las muestras indicaron el porcentaje de flavonoides presentes en *L. racemosa*.

Tabla 10. Cuantificación de flavonoides

Porcentaje de flavonoides detectado en <i>L. racemosa</i>
0.048%

En el análisis cualitativo de flavonoides, se presentó una ligera coloración rojiza característica de estos, en el extracto clorofórmico; por lo tanto, se dedujo que el porcentaje de este metabolito era bajo en la planta y se corroboró en el análisis cuantitativo subsecuente (tabla 10).





6.3.4 Cuantificación de taninos

En las pruebas de identificación de taninos, una presencia clara de ellos fue la coloración azul intensa que éstos mostraron. La cuantificación se realizó mediante espectrofotometría UV-visible. A continuación se muestran los valores de las absorbancias obtenidas para la construcción de la curva de calibración. Utilizando ácido tánico como referencia.

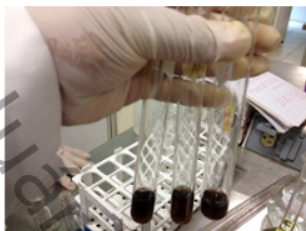


Figura 14. Taninos hidrolizables identificados

Se analizó la linealidad de la curva de calibración del ácido tánico, y se obtuvo un coeficiente de correlación mayor a 0.90, esto permitió calcular la concentración de taninos presentes. Los valores de absorbancia encontrados para las distintas concentraciones del estándar se presentan en la tabla 11.

Tabla 11. Valores promedio detectados en los estándares de ácido tánico

Estándares	Concentración En mg/mL	Absorbancias
Patrón 1	1.0	0.227550924
Patrón 2	2.0	0.302766234
Patrón 3	3.0	0.401680619
Patrón 4	4.0	0.51776433
Patrón 5	5.0	0.688668072

Los resultados presentados a continuación, equivalen a los taninos presentes en hojas de la planta y fueron identificados como hidrolizables, sin que se apreciara la presencia de taninos condensados; a diferencia de otros tipos de mangle, como el rojo por ejemplo, (*R. mangle*) donde se reporta que el 80% los taninos encontrados en la corteza, son catequinas y



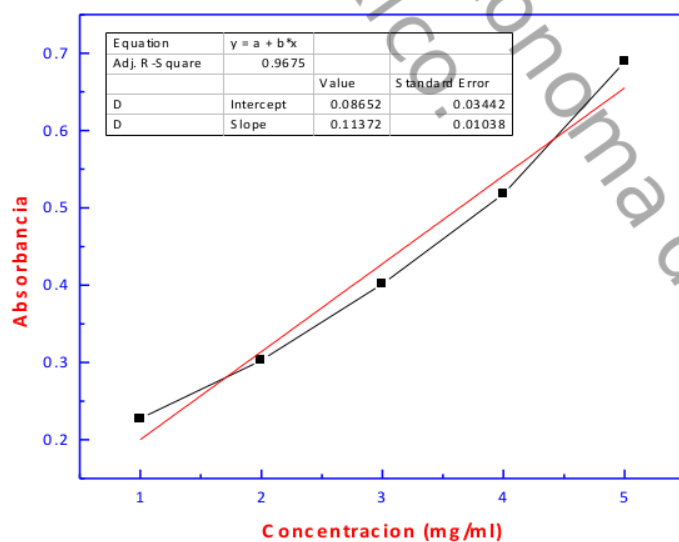
epicatequinas,⁴² mismos que se probaron como larvicidas en estrongílicos gastrointestinales de ovinos, obteniendo excelentes resultados, atribuyendo el efecto a los taninos condensados.

Tabla 12. Cuantificación de taninos

Promedio en mg/g	Desviación estándar
1.709	±0.03

En este caso, el efecto molusquicida es atribuido a los taninos hidrolizables presentes y oportuno resaltar que se trabajó con el material foliar y no con la corteza, para evitar daños irreversibles en la planta.

La siguiente gráfica muestra el comportamiento de la curva estándar, donde observamos una correlación de 0.9756. (gráfica 2).



Gráfica 2. Determinación de taninos



6.4 Pruebas biológicas

Las pruebas de toxicidad sobre *G. cubensis* se realizaron en el laboratorio de Malacología en la División Académica de Ciencias Biológicas de la UJAT (figura 15).



Figura 15. Acondicionamiento de terrarios

La interrupción del ciclo de vida de *Fasciola hepatica* través del control de caracoles se considera el método más eficaz en reducir la transmisión de fasciolosis. Por lo tanto la aplicación de molusquicidas juega un papel importante en el control de la enfermedad. Como los molusquicidas químicos imponen efectos complejos sobre el hombre, los animales domésticos, los peces y la vegetación acuática, ha habido un creciente interés en molusquicidas vegetales alternativos.⁴³ El objetivo de este estudio fue investigar la actividad molusquicida de *L. racemosa* que se encuentra de manera abundante en algunos municipios del estado de Tabasco. Los extractos realizados a la planta investigada fueron probados contra el caracol adulto de *G. cubensis*. En los cuales el extracto metanólico fue significativamente ($P \leq 0.05$) activo en comparación con el hexánico y el clorofórmico.

Para cada extracto, el diseño experimental constó de cinco lotes experimentales y un testigo, cada lote con diez caracoles. Se tomó 1 gramo de cada extracto y se realizó la dilución de cada uno en 1 litro de agua. Posteriormente se aplicaron a un total de 15 lotes de caracoles, 5 para cada extracto (3 ml para cada terrario), manteniendo hidratado al grupo testigo. Transcurridas 2 h, no se observó cambio alguno en los caracoles, ya que presentaban movimiento; lo mismo trascendió en las horas siguientes. El monitoreo se realizó cada 2 h, hasta completar 24. Posteriormente fueron dejados en recuperación, ya que no se presentó mortalidad en ninguno de los terrarios, incluyendo al grupo testigo. Se verificó a las 96 h que el 100% de la especie permaneció viva.



Un siguiente paso fue aumentar la concentración con el objeto de obtener una respuesta de mortalidad del 100%. Entonces se aumentó la concentración a 20 g/L de cada extracto y de igual manera, se aplicaron 3 ml de cada uno a 15 nuevos terrarios con un lote testigo de 5 terrarios, y transcurridas 2 h se observó el efecto molusquicida, presentado sólo con el extracto metanólico, la mortalidad observada fue del 100%. Contrario al hexánico y al clorofórmico, en los cuales no se presentó tal efecto.

La concentración de 20 g/L fue elevada y sirvió como referencia para tener una visión de que se podía controlar la población de moluscos vectores en la infección de *F. hepatica* de manera orgánica.

Partiendo de estos resultados, se decidió utilizar únicamente el extracto metanólico en las próximas pruebas, esto debido al hecho de que fue el único que mostró toxicidad sobre *G. cubensis*. Se realizaron las siguientes concentraciones: 2.5 g/L, 5 g/L y 10 g/L en la búsqueda de las dosis letales 50 y 90. El procedimiento en la aplicación de las concentraciones a cada terrario, fue el mencionado anteriormente y de igual forma, se contó con un grupo control de 10 caracoles para cada muestra y fueron acondicionados de la misma manera que los tratados.

La concentración de 2.5 g/L, fue la que presentó el menor grado de toxicidad, la mortalidad de caracoles se presentó de manera lenta, ya que en las 2 primeras horas, después de la aplicación, se obtuvo un 4% de mortalidad, misma que continuó en las siguientes 4 horas. A la octava hora, aumentó a un 8%; seguida de un 10% en las siguientes 4. Al cumplir 24 h, se registró a penas el 16 %. Finalmente, el 52 % de mortalidad acumulativa se obtuvo a partir de cumplidas 72 h y se mantuvo hasta las 96 de observación.

Se aplicó también la concentración de 5 g/L, a sus respectivos terrarios, y la mortalidad se empezó a notar en las primeras 2 h, donde se obtuvo en 6% de caracoles muertos; este dato se triplicó en las siguientes 2 horas donde se presentó un 20%; para las 6 h de observación, ya se contaba con un 40%. Después de lo anterior, se presentó un 54% a las 8 horas y un 88% a las 24; obteniendo un 90% al cumplir 48 horas después de la aplicación. Cabe señalar que con esta concentración es posible encontrar un 100% de mortalidad acumulativa, aunque a partir de las 72 horas.



Por lógica, a mayor concentración, el tiempo de respuesta de mortalidad disminuye. Los resultados con la aplicación de la concentración de 10 g/L se presentaron de la siguiente manera: pasadas 2 horas, se obtuvo un 30% de especímenes muertos, el segundo registro a la cuarta hora fue del 54%; en las 6 y 8 h, el porcentaje se mantuvo en 78, a las 10 h, se registró 88, seguido de un 94% a las 12 h. En la hora 24, el porcentaje fue de 96, y a partir de las 72 h, al igual que la concentración de 5g/L, se alcanzó un 100% de caracoles muertos.

En general, se dedujo que el mangle blanco presenta una alta toxicidad, y en poco tiempo produce la muerte del caracol terrestre, resultando ser más efectivo en comparación con el mangle rojo, del que se realizaron estudios en laboratorio para probar su toxicidad sobre *Fossaria cubensis*, y se obtuvo una mortalidad del 100% sólo que en mayor tiempo.⁴⁴

El comportamiento toxicológico de *R. mangle* se debió a que los taninos constituyen los componentes mayoritarios del extracto acuoso de la corteza de *R. mangle*; de los cuales el 80% representa taninos poliméricos y el resto taninos hidrolizables, destacándose la presencia de epicatequinas, catequinas, ácido clorogénico, galotaninos elagitaninos y taninos condensados con probada actividad antiséptica.⁴²



Figura 16. Monitoreo de la especie

6.4.3 Pruebas de toxicidad con el extracto metanólico (Dosis letal).

A cada terrario conteniendo la especie, se le aplicaron 3 ml de la solución acuosa de cada extracto con la mayor concentración que fue de 20 g/L, y transcurridas 2 horas se verificó cuantos especímenes habían muerto, dando una respuesta del 100% de mortalidad. El tiempo de observación fue de 96 h.



6.4.4 Determinación de la DL_{50}

Después de obtener la dosis letal, se realizaron diluciones para encontrar las dosis letales 50 y 90 con las siguientes concentraciones: 2.5 g/L, 5g/L y 10 g/L.

Las aplicaciones se realizaron con las concentraciones mencionadas anteriormente, encontrando que en 2.5 g/L se obtiene la dosis letal 50 en un tiempo aproximado de 82 h.

6.4.5 Determinación de la DL_{90}

Posteriormente se realizó la siguiente aplicación a un nuevo lote de caracoles con la concentración de 5 g/L y es con ésta con la que obtuvimos la dosis letal 90, con 3.246 g/L exactamente en un tiempo de 55 horas aproximadamente.



Figura 17 *G. cubensis* antes y después de la aplicación del extracto metanólico

La tabla 13 muestra los resultados de pH el cual fue medido con un pHmetro marca orion y salinidad con un refractómetro marca Atago-master, tomados al extracto metanólico en diferentes concentraciones, las cuales se aplicaron a determinados lotes de especímenes.

Tabla 13. pH y salinidad del extracto metanólico

Concentración g/L	pH	Salinidad ppm
1.0	7.20	0.2
2.5	5.88	0.2
5.0	5.25	0.3
10.0	5.00	1.0
20.0	4.87	2.0



Comparando los resultados de acuerdo a las aplicaciones de las concentraciones de 1 g/L y 20 g/L, la primera no presentó efecto alguno sobre el molusco, contrario a la segunda que en menos de 2 h logró una marcada influencia sobre la especie y se consideró como la dosis letal, ya que murió el 100%.

En el extracto metanólico (que es eficiente para eliminar al molusco), se encontraron algunos metabolitos secundarios, de los cuales los más destacados fueron los taninos hidrolizables, polifenoles no nitrogenados solubles en agua con altos pesos moleculares y a los que se les atribuye el efecto molusquicida, ya que en general son tóxicos

Se encontraron también saponinas, mismas que se identificaron rápidamente y que han sido reconocidas por poseer propiedades tóxicas debido a su habilidad para formar complejos con esteroides por lo que podrían interferir en la asimilación de estos por el sistema digestivo, o romper las membranas de las células tras ser absorbidas hacia la corriente sanguínea.

De los tres extractos, únicamente el metanólico presentó toxicidad sobre *G. Cubensis*. Tanto el extracto clorofórmico como el metanólico contienen saponinas y flavonoides, aunque en el metanólico hay además una fuerte cantidad de taninos. En este punto, podemos asegurar que las saponinas y los flavonoides no deben ser suficientemente tóxicos en el molusco vector, y que la eficiencia del extracto metanólico se debe a la fuerte presencia de taninos: se infiere que el efecto molusquicida es debido a los taninos presentes en la planta.

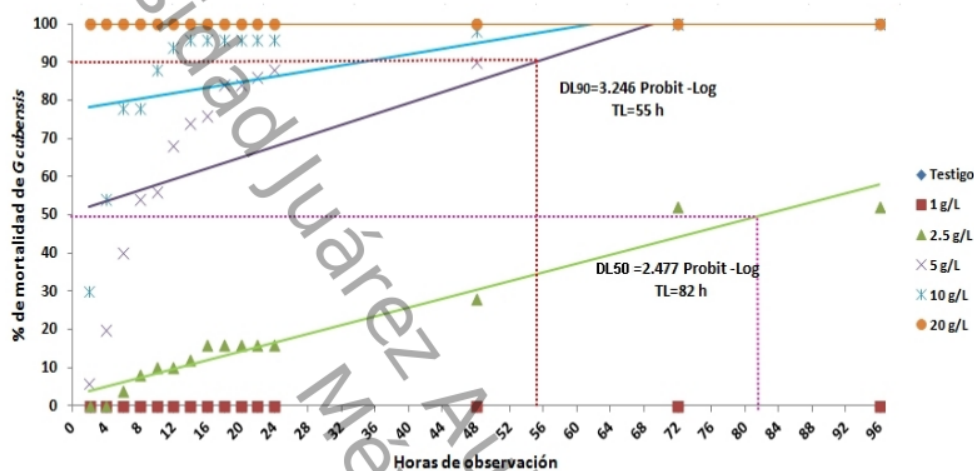
Para el procesamiento estadístico de los datos se utilizó el análisis Probit-Log,³³ en el programa \IBM\SPSS\Statistics© versión 20, y se realizó la prueba no paramétrica Kruskal Wallis.

Los valores de mayor porcentaje de actividad molusquicida se observaron para la concentración de 20 g/L $\pm$ 0.04 en el EM, con índices de mortalidad superiores al 99%. Contrario a la concentración de 2.5 g/L $\pm$ 0.06 que presentó menor actividad y no excedió el 52%; sin detectarse diferencias significativas ($P= 0.0003$) entre las cuatro concentraciones que tuvieron respuesta de mortalidad. El 90% de mortalidad se presentó en la concentración



de 5 g/L $\pm$ 0.04 y 10 g/L $\pm$ 0.01. Se determinó la existencia de diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0.05$) entre las 5 concentraciones utilizadas, siendo la de 1 g/L la diferente.

Los resultados obtenidos demuestran el poder molusquicida de las hojas de *L. racemosa*, presentando nivel de confianza en los resultados del 95%.



Gráfica 3. DL, DL₅₀ Y DL₉₀

En la gráfica anterior, se muestran las concentraciones del extracto metanólico probadas en el laboratorio, podemos observar que la concentración de 1 g/L no tuvo ningún efecto sobre *G. cubensis*, esto se observó durante 24 horas, posteriormente se dejaron en recuperación hasta cumplir 96 horas, donde se corroboró supervivencia.

La mortalidad obtenida por la aplicación de las concentraciones del extracto metanólico de *L. racemosa* sobre *G. cubensis*, en las primeras 24 horas de observación, fue del 100.00%, 30.00%, 6.00%, 4.00% y 0.00% para las concentraciones de 20 g/L, 10 g/L, 5 g/L, 2.5 g/L y 1 g/L respectivamente (tabla 14).



Tabla 14. Mortandad acumulada de *G. cubensis*
con el extracto metanólico a diferentes concentraciones

Concentración (g/L)	Mortandad* (%)
20	100
10	30
5	6
2.5	4
1	0
0 (testigo)	0

* Observada a las 2 h de aplicación del extracto en el terrario

El tratamiento testigo presentó 0.00 % de mortalidad. Se aplicó la concentración de 20 g/L a 5 terrarios los cuales contenían 10 caracoles cada uno, y se observó que todos murieron en un tiempo no mayor a 2 horas. De esta manera se encontró la dosis letal, ya que murió el 100% de la población. Posteriormente se hizo un seguimiento de la mortandad acumulada de *G. cubensis* con respecto al tiempo a diferentes concentraciones (tabla 15).

Cabe señalar que la mortalidad de los caracoles se determinó por la carencia de movimiento ante la luz y al tacto, utilizando una aguja de disección.

Tabla 15. Mortandad acumulada (%) de *G. cubensis* a diferentes tiempos

Tiempo (h)	Testigo	CONCENTRACIONES				
		1 g/L	2.5 g/L	5 g/L	10 g/L	20 g/L
2	0	0	4	6	30	100
4	0	0	4	20	54	100
6	0	0	4	40	78	100
8	0	0	8	54	78	100
10	0	0	10	56	88	100
12	0	0	10	68	94	100
14	0	0	12	74	96	100
16	0	0	16	76	96	100
18	0	0	16	84	96	100
20	0	0	16	84	96	100
22	0	0	16	86	96	100
24	0	0	16	88	96	100
48	0	0	28	90	98	100
72	0	0	52	100	100	100
96	0	0	52	100	100	100



Después de la aplicación de la concentración de 2.5 g/L, se observó en las dos primeras horas poca movilidad de los especímenes y no se registró mortalidad, pasadas las primeras 3 horas, se notó poca movilidad y posteriormente inició el efecto del extracto, ya que al revisarlos en el estereoscopio se observó que iban muriendo; se llegó a la concentración deseada donde se muestra el 50 % de caracoles muertos. El tiempo letal en esta concentración fue de 82 horas aproximadamente.

En la aplicación de la concentración de 5 g/L se encontró la dosis letal 90, con un tiempo menor al de la dosis letal 50, esto tiene lógica pues a mayor concentración, se observa una mortalidad mayor del caracol y en un menor tiempo el cual fue de 55 horas.

El efecto de la concentración de 10 g/L fue muy importante ya que se comprobó que la dosis letal 90 se había alcanzado con éxito, y en un menor tiempo; el cual se muestra en la gráfica anterior. Se decidió utilizar en bioensayos futuros la menor concentración, por razones ecológicas.

Las pruebas biológicas se realizaron en el laboratorio de malacología, se obtuvieron magníficos resultados, ya que se demostró que el extracto es efectivo para eliminar al caracol vector de infecciones parasitarias, mismo que se desea controlar para disminuir la población de éstos y de esta manera evitar infecciones por *F. hepatica* en el ganado bovino, lo que conlleva siempre al decomiso de hígados así como abortos y baja producción de carne y leche; situaciones que representan grandes pérdidas económicas para los ganaderos de muchos Estados de la República Mexicana, pero en particular para los del Estado de Tabasco.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.

CAPÍTULO 7

CONCLUSIONES



7. CONCLUSIONES

- El hábitat salino de *L. racemosa* es responsable de los contenidos de sales inorgánicas encontradas en el análisis fisicoquímico, las cuales se encuentran dentro de los valores normales.
 - La elevada concentración de taninos hidrolizables encontrados es evidenciado por el pH ácido observado.
 - En los análisis cualitativos de metabolitos secundarios en hojas de *L. racemosa*, se identificaron: esteroides y terpenoides, taninos, flavonoides y saponinas.
 - Se logró cuantificar los metabolitos predominantes en *L. racemosa* por métodos cuantitativos y semicuantitativos. La cuantificación de esteroides, taninos y flavonoides se desarrolló por espectroscopia de UV vis. Se empleó un método semicuantitativo en el análisis de saponinas (índice de espuma).
 - Se prepararon tres extractos de *L. racemosa* a partir de la maceración con tres disolventes de distinta polaridad: hexano, cloroformo y metanol. En los diferentes extractos de *L. racemosa* se identificaron diversos tipos de metabolitos dependiendo de la polaridad: en el extracto hexánico se identificaron esteroides y terpenoides; en el extracto clorofórmico se encontraron flavonoides y saponinas. Taninos, saponinas y flavonoides son identificados en el extracto metanólico.
 - De los tres extractos probados en la eliminación de la especie *G. cubensis*, sólo el metanólico presentó eficiencia y eficacia. Es ecológico, no daña flora y fauna de los alrededores donde se aplica, sólo causa efecto al molusco. El extracto de esta planta es reabsorbido al medio ambiente a las pocas horas de aplicado.
 - Se determinaron las concentraciones exactas para las dosis letales 50 y 90, así como para la dosis letal en el extracto metanólico; asimismo, se determinaron los tiempos letales 50 y 90.
 - Se atribuye el efecto molusquicida a los taninos presentes debido a que éstos poseen cierto grado de toxicidad.
- Estos resultados son alentadores, pues demuestran el potencial empleo de esta planta en el control de moluscos indeseables.

CAPÍTULO 8

BIBLIOGRAFÍA

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.



8. BIBLIOGRAFÍA*

1. López Gressa, M. d. P. Aislamiento, purificación y caracterización estructural de nuevos principios bioactivos a partir de extractos fúngicos. Universitat Politècnica de València., Valencia, España, 2006.
2. (a) Rangel-Ruiz, L. J. Estudio poblacional de la fasciolosis en el estado de Tabasco. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., 1995; (b) Cubillán, F. A.; Molero, M.; Escalona, F.; Muñoz, J.; Barrios, R. R., Prevalence and monthly EPG dynamic of Fasciola hepatica and others helminths in a bovine herd from a tropical swamp zone. *Revista Científica de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad del Zulia* **2007**, 17 (2), 111-116; (c) Phiri, A. M.; Chota, A.; Phiri, I. K., Seasonal pattern of bovine amphistomosis in traditionally reared cattle in the Kafue and Zambezi catchment areas of Zambia. *Tropical Animal Health and Production* **2007**, 39 (2), 97-102; (d) Periago, M. V.; Valero, M. A.; El Sayed, M.; Ashrafi, K.; El Wakeel, A.; Mohamed, M. Y.; Desquesnes, M.; Curtale, F.; Mas-Coma, S., First phenotypic description of Fasciola hepatica/Fasciola gigantica intermediate forms from the human endemic area of the Nile Delta, Egypt. *Infection, Genetics and Evolution* **2008**, 8 (1), 51-58; (e) Khan, M. K.; Sajid, M. S.; Khan, M. N.; Iqbal, Z.; Iqbal, M. U., Bovine fasciolosis: Prevalence, effects of treatment on productivity and cost benefit analysis in five districts of Punjab, Pakistan. *Research in Veterinary Science* **2009**, 87 (1), 70-75; (f) Ndlovu, T.; Chimonyo, M.; Muchenje, V., Monthly changes in body condition scores and internal parasite prevalence in Nguni, Bonsmara and Angus steers raised on sweetveld. *Tropical Animal Health and Production* **2009**, 41 (7), 1169-1177; (g) Cruz-Mendoza, I.; Quiroz-Romero, H.; Correa, D.; Gómez-Espinoza, G., Transmission dynamics of Fasciola hepatica in the Plateau Region of Mexico. Effect of weather and treatment of mammals under current farm management. *Veterinary Parasitology* **2011**, 175 (1-2), 73-79; (h) Qureshi, A. W.; Tanveer, A.; Maqbool, A.; Niaz, S., Seasonal and monthly prevalence pattern of fasciolosis in buffaloes and its relation to some climatic factors in northeastern areas of Punjab, Pakistan. *Iranian Journal of Veterinary Research* **2012**, 13 (2), 134-137.
3. Carrada, B. T., Fasciola hepatica: Ciclo biológico y potencial biótico. *Revista Mexicana Patología Clínica* **2007**, 54 (1), 21-27.
4. MALATERRA, G. M. T. A.-. El control biológico de plagas. Protozoos y Nematodos. Los agroquímicos. Bio-ovicidas. Los extractos de plantas. Bio-ovicidas. Las nuevas tecnologías de observación. Video cámaras con Infrarrojos. Faunística. La Monografía de las Babosas Ibéricas. <http://www.usc.es/gl/investigacion/grupos/malaterra/presente.html> - 1.
5. Fernández-Méndez, J.; Rojas-Vera, J., *Estudios molusquicidas en sustancias naturales derivadas de plantas: Fitoquímica*. EAE: 2014.
6. Hanson, J. R., *Natural Products: The Secondary Metabolites*. Royal Society of Chemistry: 2003.

* Se empleó el programa EndNote© como gestor de referencias, utilizando el formato estándar de la American Chemical Society ACS.





7. Dewick, P. M., *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach*. Wiley: 2011.
8. García, D. E.; Medina, M. G.; Ojeda, F., Effect of fertilization on the phytochemical variations and its antinutritional influence on four mulberry varieties. *Pastos y forrajes* **2004**, 27 (1), 71-74.
9. Aparicio Solano, D. M. Síntesis de (1'R)-(-)-1-(2'-hidroxi-1'-fenil-etil)-piperidin-2,4-diona. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, México, 2007.
10. Ávalos, G. A.; Pérez, U. C. Metabolismo secundario de plantas. <http://darwin.bio.ucom.es/revistas/index.php/reduca-biologia/issue/archive>.
11. Ojeda, A., Metabolitos secundarios. Importancia en la producción con especies de interés zootécnico Universidad Central de Venezuela. Facultad de Agronomía. Departamento de Producción Animal: Maracay, Venezuela, 2011.
12. Ugaz, L., Análisis fitoquímico y metabolitos secundarios. *Rev. Soc. Quím. Perú* **2000**, 72 (1), 76.
13. Díaz-Puentes, L. N., Interacciones moleculares entre plantas y microorganismos: saponinas como defensas químicas de las plantas y su tolerancia a los microorganismos. Una revisión. *Revista de Estudios Transdisciplinarios* **2009**, 1 (2), 32-55.
14. Mert-Türk, F., Saponins versus plant fungal pathogens. *Journal of Cell and Molecular Biology* **2006**, 5, 13-17.
15. Díaz, L.; Arellano, E. I.; Jiménez, K., Cuantificación de saponinas en ajo genéticamente seleccionado. In *III Encuentro participación de la mujer en la ciencia.*, CINVESTAV, Saltillo: Saltillo, Coahuila, 2010.
16. Cartaya, O.; Reynaldo, I., Flavonoides: Características químicas y aplicaciones Cultivos Tropicales. *Cultivos Tropicales* **2001**, 22 (2), 5-14.
17. Alzate Tamayo, L. M.; Jimenez Cartagena, C.; Londoño Londoño, J., Aprovechamiento de residuos agroindustriales para mejorar la calidad sensorial y nutricional de productos avícolas. *Producción + Limpia* **2011**, 6 (1), 108-127.
18. Cerezo Quezada, O. J. Evaluación del contenido de taninos (ácido tánico) en el extracto acuoso y etanólico a nivel laboratorio, obtenido del fruto del palo de cera o arrayán o cera san pascual (myrica cerifera) recolectados de los bosques naturales del área nor-central de Guatemala. . Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala, 2005.
19. Zhang, L.-l.; Lin, Y.-m., Tannins from *Canarium album* with potent antioxidant activity. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B* **2008**, 9 (5), 407-415.
20. Monteiro, J. M.; de Albuquerque, U. P.; Araújo, E. d. L.; de Amorim, E. L. C., Taninos: uma abordagem da química à ecologia. *Quim. Nova* **2005**, 28 (5), 892-896.
21. Romero, L. C. Efecto del pastoreo con ovinos sobre la concentración de taninos condensados en *Gliricidia sepium* (Jacq) Walp en el trópico seco. . Universidad de Colima, Colima, México, 2000.
22. Bouchet, P.; Rocroi, J.-P.; Bieler, R.; Carter, J. G.; Coan, E. V., Nomenclator of Bivalve Families with a Classification of Bivalve Families. *Malacologia* **2010**, 52 (2), 1-184.
23. Ibarra Velarde, F.; Vera Montenegro, Y.; Munguía Xóchihua, J., Epidemiología de la fasciolosis animal y humana. In *Epidemiología de enfermedades parasitarias en animales domésticos*, 1 ed.; Quiroz Romero, H.; Figueroa Castillo, J. A.; Ibarra Velarde, F.; López Arellano, M. E., Eds. FMVZ-UNAM: México, D.F., 2011; pp 137-172.
24. Becerra Roza, W. M., Consideraciones sobre estrategias sostenibles para el control de *Fasciola hepática* en Latinoamérica. *Rev Col Cienc Pec* **2001**, 41 (1), 28-35.





25. Londoño, P.; Chavez, A.; Li, O.; Suárez, F.; Pezo, D., Presencia de caracoles Lymnaeidae con formas larvianas de Fasciola hepatica en altitudes sobre los 4000 MSNM en la sierra del sur del Perú. *Rev Inv Vet Perú* **2009**, 20 (1), 58-65.
26. Rangel Ruiz, L. J., Fossaria viatrix Orbigny, hospedero intermediario de Fasciola hepatica Linnaeus, en Tabasco, México. *Walkerana* **1994**, 7 (17/18), 29-37.
27. Rangel Ruiz, L. J.; Martínez Durán, E., Pérdidas económicas por decomiso de hígados y distribución geográfica de la fasciolosis bovina en el estado de Tabasco, México. *Veterinaria México* **1994**, 25, 327-331.
28. Cruz-Mendoza, I., Epidemiología y control de los huéspedes intermediarios de Fasciola hepatica. In *Epidemiología de enfermedades parasitarias en animales domésticos*, 1 ed.; Quiroz Romero, H.; Figueroa Castillo, J. A.; Ibarra Velarde, F.; López Arellano, M. E., Eds. FMVZ-UNAM: México, D.F., 2011; pp 173-207.
29. Laboratory Identification of Parasitic Diseases of Public Health Concern. <http://www.cdc.gov/dpdx/fascioliasis/index.html>.
30. Hevia Jimenez, Y.; Tacoronte Morales, J. E.; Sánchez-Noda, J.; A, V.-P. A.; Gutiérrez, A.; Tiomno Tiomnova, O.; Meza-Díaz, A., Estudios de Laboratorio sobre la acción molusquicida de a resina de pino, colofonia, sobre Biophalaria havanensis. *Rev. Cubana Med. Trop.* **2008**, 60 (2), 187-189.
31. Magaña Alejandro, M. A., *Vegetación y Flora del Municipio de Paraíso*. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco: Villahermosa, Tabasco, 2010.
32. Torres-Bahena, E., Mangle blanco (*Laguncularia racemosa*). In *Fichas de especies mexicanas*, 2009 ed.; Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad y Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas CONABIO-CONANP: México, D.F., 2009; p 5.
33. Hahn, E. D.; Soyer, R. Probit and Logit Models: Differences in a Multivariate <http://www.repositoriodigital.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/15764/>.
34. Gonzalez-Cruz, D.; San Martín, R., Molluscicidal effects of saponin-rich plant extracts on the grey field slug. *Ciencia e investigación agraria* **2013**, 40 (2), 341-349.
35. (a) Rangel Ruiz, L. J., Seasonal variation in Fossaria viatrix in the municipality of Teapa, Tabasco, Mexico. *Malacol. Rev.* **1995**, 28, 71-79; (b) Rangel Ruiz, L. J.; Gamboa-Aguilar, J., Estructura de la comunidad y dinámica poblacional de gasterópodos en una zona enzoótica de fasciolosis en Tabasco, México. *Acta Zoológica Mexicana* **2005**, 21 (2), 79-85; (c) Rangel-Ruiz, L. J.; Albores-Brahms, S. T.; Gamboa-Aguilar, J., Seasonal trends of Paramphistomum cervi in Tabasco, Mexico. *Veterinary Parasitology* **2003**, 116 (3), 217-222; (d) Rangel-Ruiz, L. J.; Marquez-Izquierdo, R.; Bravo-Nogueira, G., Bovine fasciolosis in Tabasco, Mexico. *Veterinary Parasitology* **1999**, 81 (2), 119-127; (e) Ruiz R, A. G. Toxicidad de Laguncularia racemosa y Avicennia germinans sobre Lymnaea (Fossaria) viatrix hospedero intermediario de Fasciola hepática en Tabasco, México. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Villahermosa, Tabasco, 2006.
36. Secretaría de Salud, M., *Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos*. Secretaría de Salud: Mexico, DF, 2001.
37. Aguilar-Domínguez, D. E. Análisis fisicoquímico y fitoquímico de la hoja de papaya (Carica papaya) y su evaluación del efecto hipoglucemiante en ratas diabéticas. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Villahermosa, Tabasco, 2013.





38. Gómez, E.; López, U.; López, J. N.; Díaz, G. J., *Catálogo de plantas medicinales de uso actual en el estado de Tabasco*. Fundación produce Tabasco, A.C.: 2004.
39. Marín Medina, F. d. J. Caracterización fitoquímica de las partes aéreas (hojas y tallos finos) del mangle rojo (*Rhizophora mangle*) y mangle blanco (*Laguncularia racemosa*). Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Cunduacán, Tabasco, 2014.
40. Palou Oliver, A.; Segura, C. P.; Bonet Piña, M. L.; Oliver Vara, P.; Serra Vich, F.; Rodríguez Guerrero, A. M.; Ribot Riutort, J., *El libro blanco de los esteroides vegetales en alimentación*. 2 ed.; Unilever Foods S.A.: Madrid, 2005.
41. Palacios-Palacios, M. I., Texto digital de farmacognosia y fitoquímica. Universidad Católica Los Angeles de Chimbote: 2013.
42. Alemán, Y.; Sánchez, L.; Pérez, T.; Rodríguez, Y.; Olivares, J.; Rodríguez, J., Actividad larvicide de extractos de *Rhizophora mangle* l. contra estrongídeos gastrointestinales de ovinos. . *Revista de Salud Animal* **2011**, *33*, 111-115.
43. Abo Zaid, K. H.; El-Wakil, H.; El-Hussein, A.; Jomaa, S.; Shohayeb, M., Evaluation of the Molluscicidal Activity of *Punica granatum*, *Calotropis procera*, *Solanum incanum* and *Citrullus colocynthis* Against *Biomphalaria arabica*. *World Applied Sciences Journal* **2013**, *26* (7), 873-879.
44. Carrillo-Contreras, J., Eficiencia del extracto acuoso de *Rhizophora mangle* sobre *Lymnaea* (Fossaria) *cubensis*, hospedero intermediario de *Fasciola hepatica* en condiciones de campo. *Kuxulkab'* **2009**, *15* (28), 45-50.



ANEXOS

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

ANEXOS

REACTIVOS UTILIZADOS

Reactivo de Dragendorff

Preparar soluciones A y B.

A: Disolver 0.85 g de nitrato de bismuto (III) y 10 g de ácido tartárico en 40 mL de agua destilada.

B: Disolver 5.3 g de yoduro de potasio en 13.3 mL de agua.

Mezclar ambas soluciones en partes iguales y refrigerar.

Reactivo de Liebermann-Burchard

Se mezclan a 0°C 1 mL de anhídrido acético y 1 mL de cloroformo, después se añade una gota de ácido sulfúrico concentrado. Este reactivo se prepara en baño de hielo inmediatamente antes de usarse.

Solución amoniacal

Una solución de 8 g/L de NH_3 se prepara diluyendo 0.8928 mL de hidróxido de amonio en 100 mL de agua.

Bioensayo de los extractos de Laguncularia racemosa, mediante la evaluación de la toxicidad sobre Galba cubensis.

ORIGINALITY REPORT

16%

SIMILARITY INDEX

PRIMARY SOURCES

1	www.agro.unlpam.edu.ar Internet	233 words — 2%
2	riunet.upv.es Internet	201 words — 1%
3	www.slideshare.net Internet	183 words — 1%
4	farmacopea.org.mx Internet	181 words — 1%
5	4cdstuypensalejandra.blogspot.com Internet	176 words — 1%
6	www.scribd.com Internet	165 words — 1%
7	www.redalyc.org Internet	134 words — 1%
8	uchile.cl Internet	99 words — 1%
9	dokumen.tips Internet	92 words — 1%

10	digeset.ucol.mx Internet	89 words — 1 %
11	es.scribd.com Internet	67 words — < 1 %
12	repositorio.unu.edu.pe Internet	56 words — < 1 %
13	biozoo.com.mx Internet	55 words — < 1 %
14	repositorioinstitucional.buap.mx Internet	53 words — < 1 %
15	repositoriodigital.tuxtla.tecnm.mx Internet	47 words — < 1 %
16	es.slideshare.net Internet	45 words — < 1 %
17	kupdf.net Internet	44 words — < 1 %
18	dspace.unitru.edu.pe Internet	43 words — < 1 %
19	www.vanstockum.nl Internet	42 words — < 1 %
20	repositorio.unal.edu.co Internet	40 words — < 1 %
21	hdl.handle.net Internet	33 words — < 1 %

EXCLUDE QUOTES ON
EXCLUDE BIBLIOGRAPHY ON

EXCLUDE SOURCES OFF
EXCLUDE MATCHES < 30 WORDS